Paris 1970

FACULTE DE MEDECINE BICHAT BEAUJON

Année 1970

1

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE
(Diplôme d'Etat)

Par

René ROUILLAC,
né le 20 octobre 1923, à St-Symphorien (Indre & Loire)

Présentée et soutenue publiquement le 20 Nov 1970

INTERET DE L'ETUDE DES TRIGLYCERIDES DU SANG

CHOIX DES TECHNIQUES D'EXAMEN.

Président : M. Charles DEBRAY, Professeur

Polycopie Gilanne : 36 rue Falguière, Paris XVe

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551621_0014

FACULTE DE MEDECINE BICHAT BEAUJON

Année 1970

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE
(Diplôme d'Etat)

Par

René ROUILLAC,

né le 20 octobre 1923, à St-Symphorien (Indre & Loire)

Présentée et soutenue publiquement le 20 Nov 1970

INTERET DE L'ETUDE DES TRIGLYCERIDES DU SANG.

CHOIX DES TECHNIQUES D'EXAMEN.

Président : M. Charles DEBRAY, Professeur

Polycopie Gilanne : 36 rue Falguière, Paris XVe

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A la mémoire du Doyen René FABRE,

membre de l'Institut,

qui fut mon premier " Patron "

dans les Hôpitaux de Paris.

A mon Maître, Monsieur le Professeur Jean CHEYMOL

Professeur honoraire à la Faculté de Médecine

de Paris,

Pharmacien honoraire des hôpitaux de Paris,

Membre de l'Académie nationale de Médecine,

Commandeur de la Légion d'honneur.

Hommage de vive reconnaissance

et de profond attachement, pour les

dix années passées dans son Service.

A Monsieur le Professeur Charles DEBRAY,

Professeur de Clinique d'hydrologie et de climatologie à la Faculté de Médecine de Paris,

Chevalier de la Légion d'Honneur,

Pour le remercier d'avoir bien voulu accepter la présidence de cette thèse.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Georges LEMOAN,

Professeur à la Faculté de Pharmacie

de Paris,

Pharmacien des hôpitaux de Paris,

Membre de l'Académie de Pharmacie,

qui sait être avec autant de

bonheur le Patron et l'Ami ;

qu'il veuille croire en mon

indéfectible attachement.

A tous mes Maîtres

de la Faculté de Médecine,

de la Faculté de Pharmacie

des Hôpitaux de Paris.

Aux Amis, Médecins, administratifs,

Laborantines du C. I. E. M.,

à qui je dois d'avoir pu mener

à bien ce travail.

A mon Père,

A ma Mère,

A ma Femme,

A mes enfants

Annie

et Laurent.

INTRODUCTION

L'étude approfondie des lipides du sérum sanguin est assez récente.

A cela, plusieurs raisons :

1° - L'obésité de l'homme pléthorique a longtemps paru un phénomène heureux. Ce sont les inquiétantes constatations des anatomopathologistes qui portèrent les premiers coups à la conception de l'homme de poids, homme fort. La vue du système artériel infiltré, obstrué même de plaques athéromateuses attira l'attention des médecins sur l'intérêt qu'il y avait à étudier les lipides circulants et le métabolisme des graisses en général.

2° - La composition chimique des graisses végétales et animales était déjà connue dans l'industrie depuis longtemps alors que celle des lipides du sang l'était encore très peu. Le biochimiste devait faire porter son étude sur des prises d'essai qui ne permettaient pas, avec les moyens dont il disposait il y a 30 ans, de faire progresser ses connaissances.

C'est la richesse des techniques analytiques apparues dans les 20 dernières années qui explique l'accroissement rapide de notre compréhension du métabolisme lipidique de l'homme :

Emploi des isotopes, fractionnement par chromatographie en couche mince, par chromatographie gazeuse, progrès des méthodes spectrophotométriques, fractionnement électrophorétique.

Ceci a permis de dissocier plusieurs classes de composés dans l'extrait lipidique total.

Nous rappellerons donc les définitions et la structure des divers lipides rencontrés.

LES LIPIDES

STRUCTURE :

Ce sont des composés insolubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques, dérivés d'acides aliphatiques à nombre élevé d'atomes de carbone, plus de 4, généralement 16, 18 ou 20, estérifiant des alcools.

Classification selon BLOOR :

- Les lipides simples :

Les glycérides, produits de l'estérification d'une, deux ou trois fonctions alcool du glycérol par la fonction acide d'acides gras donnant les mono-, di-, triglycérides.

Les acides gras peuvent être identiques ou différents, saturés ou insaturés à 1, 2 ou 3 double s liaisons.

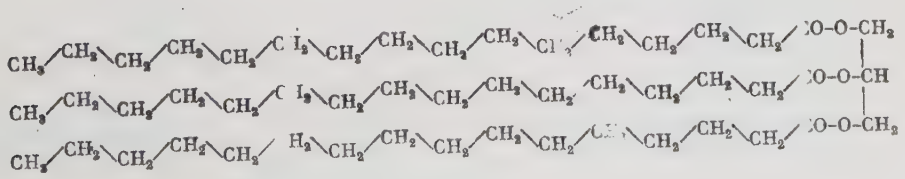
Les plus fréquents sont :

- l'acide palmitique en C 16 saturé
- l'acide oléique en C 18 insaturé 1 double liaison
- l'adice linoléique en C 18 insaturé 2 doubles liaisons
- l'acide linolénique en C 18 insaturé 3 doubles liaisons

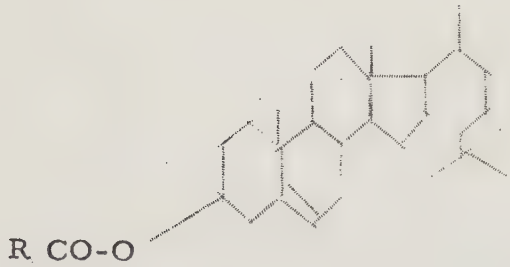
à nombre pair d'atomes de carbone.

Les acides insaturés de la série linoléique sont indispensables.

Triglycéride-type : le tripalmitate de glycéryle ou tripalmitine.



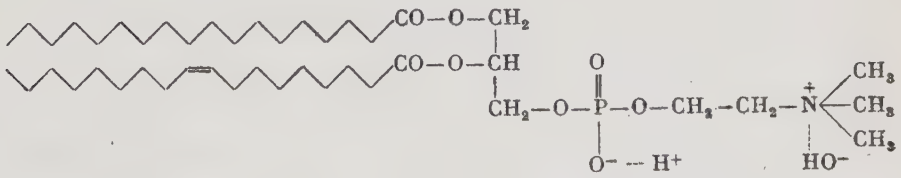
Les stérides , esters d'acides gras et d'un monoalcool secondaire le cholestérol.



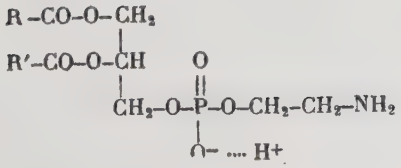
R= reste aliphatique 1 acide gras

- Les lipides complexes ou hétérolipides : principalement les phospholipides, glycérophosphatides où le glycérol est estérifié par des acides gras et de l'acide phosphorique.

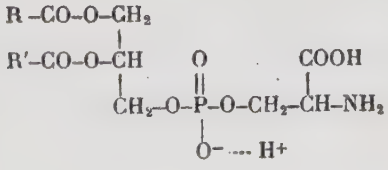
Ce dernier peut être lié à une base aminée :
la choline, dans les lécithines
l'éthanolamine ou la sérine, dans les céphalines.



Lécithine



Phosphatidylcolamine



Phosphatidylsérine

Céphalines

Les sphingolipides : Le glycérol est remplacé par un alcool aminé la sphingosine . et l'acide gras est lié à l'alcool aminé par une fonction amide et non une fonction ester.

La sphingomyéline.

PROPRIETES :

Tous ces composés ont en commun la propriété d'être insolubles dans l'eau, solubles modérément dans l'alcool et solubles dans les solvants organiques : chloroforme, benzène, méthylal ; leur fractionnement est possible par suite de l'insolubilité des phospholipides dans l'acétone.

Nous n'examinerons pas ici le cas particulier du cholestérol et de ses esters.

Nous ne parlerons des phospholipides que dans la mesure où ils interviennent dans le métabolisme des triglycérides.

Seuls, les triglycérides nous occuperons.

LES TRIGLYCERIDES

Etat des triglycérides circulants :

. L'insolubilité des corps gras dans l'eau

. Le fait que les solvants des graisses n'extraient qu'une part infime des lipides du sérum indiquent que ceux-ci sont solubilisés, ainsi que MACHEBOEUF l'a montré dès 1929, grâce aux combinaisons complexes qu'ils forment avec certaines protéines spécifiques sous forme de "cénapses lipoprotéiques".

METABOLISME :

Notre étude porte sur les triglycérides du sérum mais les constatations que nous faisons ne sont que le résultat d'un équilibre biologique et il est indispensable, pour bien comprendre les faits, de pénétrer plus avant dans le circuit des lipides en général, des triglycérides en particulier dans l'organisme.

Un premier fait essentiel : les triglycérides circulants ont deux origines différentes :

- Triglycérides endogènes (16, 39, 40) : Une part importante est synthétisée dans l'organisme au niveau de la cellule hépatique. Celle-ci construit les acides gras à partir des acides aminés et du glucose. Dans son cytoplasme, la synthèse de la chaîne des acides gras se fait à partir de l'acétylcoenzyme A :

$$\text{Acétylcoenzyme A} + \text{ATP} + CO_2 \longrightarrow \text{malonylcoenzyme A} + \text{ADP} + \text{P minéral}$$

Avec le TPNH et des enzymes agissant en cascade, on arrive au palmityl CO A en condensant des restes malonyl.

Cette formation est sous la dépendance des disponibilités en glucose.

Les trioses phosphates, par ailleurs, conduisent au glycérol et tout est ainsi réuni pour la formation des triglycérides.

Par ailleurs, le système mitochondrial de la cellule hépatique et des muscles opère le catabolisme des acides gras par voie enzymatique selon le schéma de la β oxydation de KNOOP, et cette voie est réversible et fait, elle aussi, aboutir à la synthèse des acides gras à partir de l'acétate. Ceci a été démontré par SCHOENHEIMER et RITTENBERG à l'aide de l'acétate doublement marqué au C^{13} et au deuterium, mais cette voie est beaucoup moins importante que la précédente.

La synthèse des acides gras insaturés fait intervenir des déshydrogénases.

- Triglycérides exogènes. : Ils sont apportés par l'alimentation. L'étude de leur absorption a beaucoup progressé depuis dix ans.

La majorité des lipides alimentaires est constituée de triglycérides. La ration journalière est d'environ 150 gr., formée de triglycérides - à acides gras saturés, principalement graisses animales ;
- à acides gras insaturés, principalement graisses végétales.

L'hydrolyse à peine ébauchée par une lipase gastrique (2, 9, 18) commence réellement dans le duodenum. La lipase du suc pancréatique (2, 8, 10, 17, 18, 28), en présence des sels biliaires, attaque les glycérides, préférentiellement en 1 et 3 (9, 17, 31) ou aboutit aux di- puis aux monoglycérides arrivant aux α monoglycérides, la forme β étant instable et transitoire (9). De plus, l'hydrolyse, état d'équilibre dans la lumière intestinale, n'est jamais complète (7, 17). :

60 % d'acides gras non estérifiés,
40 % d'acides gras estérifiés.,

se présentent à l'absorption des monoglycérides et des acides gras non attaqués. C'est la bile qui, à ce moment, joue le rôle essentiel par les sels biliaires (2) et la lécithine transformée dans l'intestin en lysolécithine (38) qu'elle contient. Ces substances constituent des micelles mixtes présentées à l'absorption au niveau des villosités intestinales.

Les acides gras et les monoglycérides pénètrent seuls dans les cellules intestinales par pinocytose, laissant les sels biliaires libres pour un nouveau cycle de transport. L'étude a été faite au niveau cellulaire, au microscope électronique, par ASHWORTH C. T., STEINBRIDGE V. A., SANDERS E. (3) et par PALAY S. L. (35).

Après pénétration dans la cellule, les corpuscules lipidiques entourés d'une membrane progressent vers la lumière intracellulaire en augmentant de taille. Cet accroissement s'accompagne d'une resynthèse des triglycérides. Celle-ci utilise comme matériaux les acides gras venant de l'hydrolyse intestinale mais aussi les acides gras libres circulants d'origine endogène. Amenés à l'état d'acides gras coenzymes A, ils estérifient les α glycérophosphates fournis par le glucose. Ils estérifient les monoglycérides alimentaires grâce aux acylases des microsomes.

Cette gouttelette grasse formée principalement de triglycérides a une composition voisine de celle des graisses alimentaires. Elle est excrétée hors de la cellule dans l'espace intercellulaire. C'est devenu un chylomicron recouvert d'une coque protéique additionnée de phospholipides et de cholestérol.

Le chylomicron traverse la lamina propria et pénètre dans les canaux lymphatiques en écartant les cellules de la paroi. Il gagne les ganglions et le canal thoracique d'où il accède à la circulation sanguine. Il est suivi par sa taille et les propriétés optiques qu'il confère au sérum. On sait ainsi qu'il faudra 8 à 14 heures pour le voir disparaître sous l'action conjuguée de l'activité hépatique et tissulaire.

De tout ceci, on voit ressortir l'intérêt de l'étude de la triglycéridémie. Elle pourra objectiver des troubles d'absorption intestinale surtout si l'on sensibilise son étude par des tests dynamiques.

- Elle sera perturbée par excès d'apport alimentaire, glucidique comme lipidique ;
- et aussi, par un trouble profond de l'anabolisme ou du catabolisme.

METHODES D'ETUDE

Comment aborder cette étude ?

Ce qui précède nous indique que deux voies principales s'offrent à nous :

- L'emploi de méthodes physiques s'intéressant à la qualité des lipoprotéines du sérum.

- L'emploi de méthodes chimiques quantitatives isolant les triglycérides et déterminant leur taux.

Ces méthodes seront couplées puisque nous avons vu que le dosage chimique ne pouvait faire de différence entre triglycérides endogènes et exogènes - ce que pourra faire le fractionnement physique des lipoprotéines.

I. METHODES CHIMIQUES DE DOSAGE -

On s'est longtemps contenté pour l'appréciation des graisses e neutres du sérum, de déductions calculées à partir du taux des lipides totaux du sérum et du cholestérol. On admettait que le chiffre des lipides totaux devait être égal au plus à trois fois le taux du cholestérol. S'il représente davantage, le "hiatus dénonciateur" selon de GENNES, indique qu'il y a une élévation des triglycérides. Cependant, l'imprécision du procédé est grande, et très vite on en est venu au dosage proprement dit.

Deux possibilités ont fait l'objet de développements très inégaux :

a) Détermination des acides gras estérifiés selon GALETTI F. (21).

Principe : Les acides gras estérifiés, isolés par l'isopropanol, réagissent en milieu alcalin avec l'hydroxylamine. Il se forme des acides

hydroxamiques. Ceux-ci donnent avec les sels ferriques une coloration brun rouge, mesurée en m . L'étalon utilisé est la trioléine.

Résultats : taux inférieur ou égal à 3 g 80pour mille suivant le niveau de la lipémie, mais ce n'est pas la triglycéridémie car sont également mesurés ainsi les acides gras des phospholipides et des esters du cholestérol.

b) Dosage du glycérol libéré par les triglycérides. Cette méthode est à peu près abandonnée au profit de méthodes beaucoup plus spécifiques des graisses neutres puisque toutes s'attachent à doser le glycérol combiné aux acides gras.

Toutes ces méthodes extraient, au préalable, l'ensemble des lipides. Cet extrait est privé des phospholipides dont le glycérol serait dosé alors qu'ils ont une destinée particulière.

- Les esters sont alors hydrolysés

- Le glycérol libéré est dosé de diverses façons :

PAR VOIE ENZYMATIQUE

par la réaction de Kreutz - Méthode de ALTMANN A., BACH A. et METAIS P. (1)

Le glycérol est phosphorylé par l' A T P en présence de glycérokinase : on obtient du glycérophosphate et de l'adénosine diphosphorique A D P.

Celui-ci est dosé par la pyruvatekinase et la lacticodéshydrogénase en présence de NADH et de magnésium comme effecteur à pH 7,2.

La diminution d'absorption à 340 mμ , due à la transformation NADH $\longrightarrow$ NAD, est proportionnelle au taux de glycérol.

L'étalon employé est du glycérol.

Voici la suite des réactions :

1. Glycérol + A T P $\rightleftharpoons$ α glycérophosphate + ADP
2. A D P + phosphoénolpyruvate $\xrightleftharpoons{\text{pyruvatekinase}}$ A T P + pyruvate
3. Pyruvate + NADH + H^+ $\xrightleftharpoons{\text{LDH}}$ Lactate + NAD

Réactifs

- Solution tamponnée 0,3 M à pH 7,2

  100 ml de cette solution contiennent :

  - 5,56 g de chlorhydrate de triéthanolamine (Flucka)
  - 0,65 g de carbonate de sodium pur R. P.
  - 0,100 g de sulfate de magnésium pur $SO_4Mg\ 7\ OH_2$ R. P.

  Bonne conservation à 4° C.

- Solution de cosubstrats : Dissoudre dans :

  - 5 ml de solution de bicarbonate de sodium à 5 %
  - 25 mg de sel de sodium de NADH (Boehringer)
  - 100 mg de sel de sodium d'adénosine 5' triphosphate Boehringer
  - 50 mg de sel de sodium de phosphoénolpyruvate Boehringer.

  Bonne conservation à 4° C, quelques semaines.

- Solution A d'enzymes : Mélanger, à parties égales, la suspension de lacticodéshydrogénase à 5 mg par litre et celle de pyruvate-kinase à 2 mg par ml Boehringer.

  Conservation à 4° C.

- Solution B d'enzymes glycérokinase à 1 mg par ml Boehringer.

  Conservation à 4° C.

- Solution stock de glycérol à 1 g de glycérol pur R. P. par litre d'eau distillée.

Conservation à 4° C.

- Solutions diluées de glycérol : dilution dans l'eau bidistillée de la solution stock, pour obtenir des solutions de concentration allant de 0 à 0,25 g p. 1.000.

- Solution de potasse alcoolique à 2 % : préparation extemporanée par dilution dans l'alcool à 95° d'une solution aqueuse de potasse à 50%.

- Solution d'acide sulfurique N.

- Doucil Taylor (Zéolite Doucil)[x] : Pulvériser la résine au mortier et la tamiser à 80-100 mesh ; l'activer avant emploi par chauffage de 10 heures à 120° C.

Conserver en flacons bien bouchés.

- Chloroforme R. P.

Matériel

- Matériel courant et
- Spectrophotomètre pouvant lire à 340 mμ, avec
- Porte-cuve thermostaté, par exemple Spectrophotomètre Maroc de Jobin Yvon, muni du dispositif sur lequel est branché un
- Bain-marie règlable, à circulation.

Prélèvement

On prélève 5 ml de sang, sans anticoagulant, par ponction veineuse au pli du coude chez un sujet à jeun depuis 12 heures.

Mode opératoire

1. Isolement des triglycérides (celui-ci est emprunté à la méthode de van HANDEL et ZILVERSMIT).

---

x Zéolite Doucil W.A. Taylor C°, 7300 York Road, Baltimore - Importée par TOUZAT & MATIGNON, 3 rue Amyot - PARIS V^{e}.

Dans un tube de 50 ml à bouchon rodé de verre ou de polyéthylène, placer 2 g de Doucil activée, ajouter 3 ml de chloroforme, agiter pour imprégner la résine.

Ajouter 0cc 4 de sérum et agiter fortement 3 minutes, soit à la main, soit à l'aide d'un agitateur mécanique. Ajouter encore 7 ml de chloroforme, boucher et agiter 5 minutes, centrifuger 10 mn à 2.500 tours par minute.

Décanter soigneusement à la pipette 4 cm^3 de $CHCl_3$ surnageant, les placer dans un petit ballon de 10 cm^3 au rodage duquel est adapté un petit réfrigérant et distiller le solvant sous pression réduite à température inférieure à 40°.

2. Hydrolyse des triglycérides.

Sur le résidu sec, verser 1 ml de solution de potasse alcoolique, installer le réfrigérant à reflux - chauffer 30 minutes à 80-90°.

La saponification terminée, laisser refroidir et neutraliser avec 0,6 ml d'acide sulfurique N. On voit précipiter les acides gras libérés, le glycérol reste en solution hydroalcoolique.

Transvaser dans une fiole jaugée de 5 ml et compléter à 5 ml avec la solution tampon pH 7,2 en rinçant le ballon d'hydrolyse. Filtrer la solution trouble sur filtre sans cendre. Le dosage du glycérol se fera sur une partie aliquote du filtrat.

3. Dosage du glycérol.

Dans une cuvette de quartz du spectrophotomètre, ajouter en les mélangeant :

- filtrat	3 ml
- cosubstrat	0 ml 15
- solution A d'enzyme	0 ml 01

Mélanger à l'aide d'une baguette plastique pour ne pas rayer les parois de la cuve de quartz, attendre 3 mn et mesurer E_1 à 340 mμ ; ajouter alors : Solution B d'enzymes 0, ml 01 ; mélanger et attendre 15 mn ; déterminer à nouveau la densité optique E_2. On peut aussi tracer la pente de décroissance de la densité optique de minute en minute.

ΔE entre E_1 et E_2, pour chaque point donne la teneur en glycérol.

4. Etalonnage.

Dans une série de 6 cuves de quartz, placer :

- Solution tamponnée	3 ml
- Solution de cosubstrat	0 ml 15
- Solutions diluées de glycérol 0 à 50γ	0 ml 2
- Solution A d'enzyme	0 ml 01

Mélanger, déterminer la densité optique E_1 et ajouter

- Solution B d'enzyme	0 ml 01

Mélanger, attendre 15', déterminer la nouvelle densité optique E_2.

La différence permet de tracer une droite d'étalonnage.

5. Calcul des résultats.

On calcule à l'aide de la courbe d'étalonnage la quantité de glycérol présente dans l'échantillon.

On arrive à la teneur en triglycérides en prenant pour poids moléculaire moyen des triglycérides sériques : 884. Le poids moléculaire du glycérol étant de 92 :

Glycérol en μg dans la prise d'essai $\times \frac{884}{92} \times \frac{5}{3} \times \frac{10}{4} \times \frac{1000}{0,4} \times 10^{-6}$ = Triglycérides en g/litre

Les résultats normaux de cette méthode sont, selon les auteurs :

0 g 96 pour 1000 $\pm$ 0,36

Avantages : bonne méthode reproductible et spécifique.

Inconvénients :

- réactifs délicats et onéreux
- méthode se prêtant mal aux grandes séries

Ce point de vue pourrait être révisé puisque, actuellement, apparaissent des appareils automatiques type Eppendorf ou L K B capables de faire des techniques enzymatiques en série à 340 mμ.

PAR VOIE CHIMIQUE

Méthode de CARLSON et WADSTROM (13)

Cette méthode est très comparable dans son 2è temps à celle de van HANDEL et ZILVERSMIT que nous examinons ensuite en détail pour ce qui est du dosage du glycérol des triglycérides neutres.

Elle en diffère dans le premier temps par la technique et les réactifs employés pour extraire et purifier les extraits soumis au dosage.

Extraction.

1er but, toujours identique : extraction des lipides par le chloroforme à chaud.

Elimination des phospholipides par chromatographie sur colonne d'acide silicique Hyflosuper col.On fait une chromatographie à blanc des réactifs.

On passe la solution chloroformique sur la colonne et on élue au chloroforme. Sur une partie aliquote du substrat évaporé, on effectue le dosage du glycérol comme nous allons le voir dans la méthode de van HANDEL et ZILVERSMIT.

Méthode de van HANDEL et ZILVERSMIT (26).

Principe :

Les lipides du sérum sont extraits par le chloroforme en présence d'une résine zéolite qui doit adsorber les phospholipides.

L'extrait évaporé est soumis à l'hydrolyse de la potasse alcoolique qui libère les acides gras et le glycérol.

Le glycérol est oxydé par le périodate en aldéhyde formique. Après destruction de l'excès de périodate par l'arsenite de sodium, le formol est dosé par la mesure de la réaction colorée qu'il donne avec l'acide chromotropique à 100° en milieu sulfurique concentré. La coloration violette est lue à 570 mμ en cuve de 1 cm. Un blanc doit être fait : une partie aliquote traitée de la même façon mais non soumise à la saponification permet de défalquer les substances réagissant avec le réactif chromotropique, le glycérol circulant entre autres.

Réactifs:

1. chloroforme pur pour analyser, conservé en flacon f oncé.

2. Doucil activée par chauffage de 4 heures à 125°, à conserver en flacons bien clos.

3. Potasse alcoolique à 0,4 %

a) Solution mère : dissoudre 2 g de potasse en pastille non carbonatée dans l'alcool à 95°, en ballon de 100 ml. Compléter à 100ml.

b) Solution fille : à préparer extemporanément le jour de l'emploi par dilution de la solution mère au 1/5 dans l'alcool à 95°.

4. Acide sulfurique 0,2 N (3 ml d'acide sulfurique concentré, amenés à 500 ml avec de l'eau distillée).

5. Métapériodate de sodium 0,05 M (Dissoudre 1 g 07 de IO_4Na dans 100 ml d'eau distillée.)

6. Arsenite de sodium (Dissoudre 7 g d'arsenite de Na dans 100 ml d'eau distilléeà.

7. Acide chromotropique à 0,2 %.

- Dissoudre 2 g d'acide chromotropique dans 200 ml d'eau distillée d'une part

-D'autre part, préparer séparément avec les précautions usuelles - refroidissement du ballon en courant d'eau froide - une dilution d'acide sulfurique - 600 ml d'acide sulfurique concentré R. P. sont versés dans 300 ml d'eau distillée.

-Après refroidissement, ajouter l'acide sulfurique dilué aux 200 cc de solution d'acide chromotropique.

A conserver au frigidaire.

Remarque : Il faut préparer ce réactif bien loin de toute vapeur d'aldéhyde formique.

Mais il convient également, l'expérience nous l'a montré, d'être loin de vapeurs de méthylal. Or, celui-ci voisine souvent avec le dosage des triglycérides puisqu'il est à la base de techniques jumelées. : dosage des lipides totaux et du cholestérol selon DELSAL.

Etalon tripalmitique

Matériel. Cette technique est prévue pour effectuer des séries de dosages et nécessite, de ce fait, un matériel adapté :

- tubes à centrifuger cylindriques de 50 ml, bouchés par R IN III en polyéthylène.

- 2 bains marie électriques spéciaux, des Ets LEQUEUX :
  l'un, réglé entre 60 et 70
  l'autre, à l'ébullition.

Ils sont étudiés de façon à permettre l'ébullition sans projection d'eau dans les batteries de tubes de dosage.

- un agitateur à mouvement alternatif permettant l'agitation reproductible de séries de tubes à centrifuger. Cette opération est, en effet, impossible à exécuter à la main pour un grand nombre de tubes sans retentir sur l'équilibre de la laborantine.

- une centrifugeuse classique

- un photomètre pouvant lire dans le visible à 570 mμ .

La manipulation de lecture est désagréable car on a une solution sulfurique concentrée assez visqueuse, il est bon de lire en tube plutôt qu'en cuve, de remplissage plus délicat.

- des répartiteurs automatiques [x] mis au point par nous, permettant de distribuer le chloroforme en série sans pipettage, pour 2 ml et pour 18 ml.

Technique.

Extraction :

1. Préparation d'un extrait privé des phospholipides.

Dans un tube à centrifuger, de 50 ml, à bouchon de polyéthylène, mettre 4 g de Doneil, ajouter 2 ml de chloroforme et agiter vigoureusement quelques secondes, à la main.

Verser goutte à goutte sur la résine 1 ml de sérum. Agiter.

Ajouter 18 ml de chloroforme au répartiteur automatique, bien boucher et porter 10 minutes sur l'agitateur alternatif. La vitesse d'agitation doit être réglée pour bien mettre en suspension la résine dans le chloroforme.

Filtrer sur filtres sans graisses rapidement, en recouvrant l'entonnoir d'un verre de montre.

---

[x] CORNIOU, rue du Lieutenant Chauré, Paris XXe.

Préparer, pour chaque dosage, 3 tubes de 13 x 150 :

2 tubes dosage

1 tube témoin non soumis à la saponification.

Préparer, de même, 15 tubes d'étalonnage :

0 γ 25 γ 50 γ 75 γ 100 γ ou

pour chaque concentration, 2 tubes dosage et 1 tube témoin.

Réaction.

a) Evaporation : mettre dans tous les tubes 1 ml d'extrait chloroformique, évaporer au bain-marie à 60°.

b) Saponification : mettre dans tous les tubes dosage :

0 ml 5 de KOH alcoolique à 4 %

dans tube témoin :

0 ml 5 d'alcool à 96°.

Agiter avec soin pour bien reprendre tout l'extrait lipidique, porter au bain-marie) 60 - 70° C pendant 15 minutes.

La saponification est terminée.

Ajouter 0 ml 5 de SO_4H_2 0,2 N

Porter 15 mn au bain-marie bouillant pour éliminer l'alcool éthylique avant l'oxydation périodique.

Laisser refroidir.

c) Oxydation périodique du glycérol : Ajouter dans tous les tubes 0,1 ml de périodate Na 0,05 M - Agiter - L'addition doit être faite avec grand soin. Un si petit volume de réactif doit être mis avec précision dans le milieu où il doit agir.

10 minutes d'action et destruction de l'excès de périodate par l'arsénite de sodium.

0,1 ml dans tous les tubes - avec soin -

Agiter et attendre 4 à 5 minutes la disparition de la coloration jaune de l'iode libéré par la réaction.

d) Réaction colorée : Dans tous les tubes, ajouter 5 ml de réactif sulfurique chromotropique et porter, après agitation, au bain-marie bouillant pendant 30 minutes. La réaction est, en effet, assez lente à se mettre en route. Après ce temps, refroidir et faire la lecture des colorations.

e) Lecture : Elle se fait immédiatement au photomètre à 570 mμ en tube ou en cuve de 1 cm^3 avec les précautions indiquées plus haut. Il faut prendre soin de surveiller les parois de la cellule de mesure : celles-ci brunissent peu à peu car nous sommes en milieu acide sulfurique concentré et la carbonisation de substances organiques se déposant sur le verre fait s'élever l'absorption de base de la cuve - ceci, outre l'agressivité des réactifs à l'ébullition pour le circuit tubulaire de l'auto-analyseur Technicon, a empêché l'adaptation de cette technique à l'automatisme. Nous verrons qu'une autre voie a été utilisée pour cela.

Le O photométrique est fait sur le blanc de la gamme.

Une courbe d'étalonnage est tracée.

La réaction suit les lois de BEER LAMBERT de 0 à 75γ ; au-delà, il y a un écrasement progressif de la courbe.

Les dosages sortant de la gamme doivent être recommencés dans une série ultérieure, soit en diluant l'extrait dans le $CHCl_3$, soit en prenant des parties aliquotes inférieures : de 0,25 à 0,5 ml.

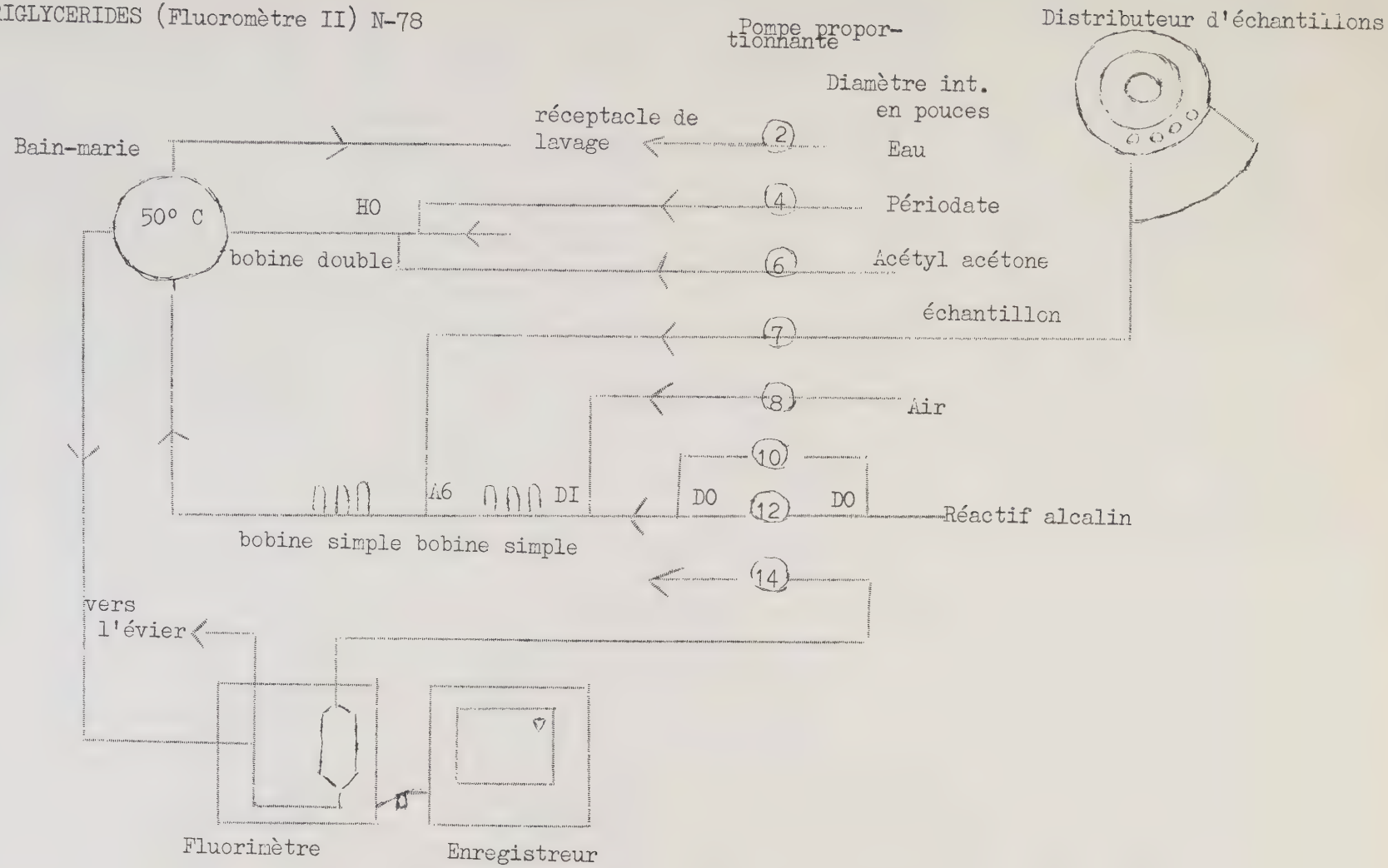
Résultats.

Cette technique que nous avons montée et adaptée à la série nous a donné toute satisfaction en plusieurs dizaines de milliers de dosage, sur plusieurs années.

Nous prenons comme zone de concentration normale :

0,95 g pour mille + 0,40, exprimés en tripalmitine

TRIGLYCERIDES (Fluoromètre II) N-78



Filtres - primaire : 400 m (interférence) Technicon part. n° 518-7023
- secondaire : 485 m (bande étroite " " " 518-7005

A U T O - A N A L Y S E U R

mais l'étude systématique de la triglycéridémie dans les bilans biologiques avec cette technique est lourde. Possible pour les séries de 10 à 20 dosages, elle devient difficile à manier pour les séries plus longues, la coloration des blancs comme des dosages pouvant évaluer au-delà de 30 minutes, il conviendrait de faire des séries de dosages successifs.

A ce stade, l'automatisation est nécessaire.

Méthode semi - automatique. de dosage de la triglycéridémie à l'autoanalyseur Technicon.

Elle repose sur les travaux de KESSLER et LEDERER (29).

Après une extraction manuelle, on réalise sur les extraits isopropyliques après une mesure automatique par fluorométrie.

Se font dans le circuit analytique : l'hydrolyse des triglycérides, l'oxydation périodique du glycérol en formaldéhyde. Celui-ci, selon la réaction de condensation de HANTCH, donne en milieu ammoniacal avec la diacetylacétone, un produit fluorescent, la 3, 5 diacétyl 1. 4 dihydrolutidine.

Oxydation et condensation se font à 50°.

Les dosages se font à la cadence de 40.

Echantillons à l'heure.

Matériel. : une chaîne analytique Technicon, comportant :

- un distributeur d'échantillons Sampler II
- un bain-marie Technicon à bobine double, règlable à 50°
- un fluorimètre II Technicon

  avec filtre primaire d'émission à 400 mμ
  et filtre secondaire d'émission à 485 mμ

- un enregistreur
- un manifold selon le schéma joint page 20.
- agitateur vibrant Tubmix à 2, 4 ou 6 postes [x]

---

x Ateliers Baudard, 2 bis rue de l'Ermitage, PARIS 20e.

Réactifs :

- isopropanol Merck pour analyses.

Chaque lot nouveau de solvant doit être testé et ne pas donner un blanc de fluorescence appréciable.

- potasse à 0, 50 g pour 100 dans l'isopropanol.

Verser dans un ballon de 1 litre à bouchon rodé :

250 ml d'eau distillée - y dissoudre par agitation ..... 5 g de KOH R. P. en pastilles

Ajouter ..... 750 ml d'isopropanol et agiter - transvaser dans un flacon de verre brun.

- périodate de K.

Verser 500 ml d'eau distillée dans un flacon d'un litre - ajouter lentement 115 ml d'acide acétique glacial et agiter - ajouter 5, 40 g de périodate de sodium - dissoudre en agitant - compléter à 1 litre.

- Acétate d'ammonium 2 M.

Verser 800 ml d'eau distillée dans un récipient d'un litre - Ajouter 154 g d'acétate d'ammonium - Ajuster le pH à 6, 0 au moyen de HCl 2 N - compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

- réactif acétylacétone.

Verser 500 ml d'acétate d'ammonium 2 M dans un flacon jaugé d'un litre, y ajouter en agitant 7, 5 ml d'acétylacétone et 25 ml d'isopropanol - compléter à un litre avec l'acétate de NH_4.

Réactif à refaire chaque jour.

- Mélange de zéolite.

Ajouter à 200 g de zéolite pulvérisée au mortier et séchée à 110° une nuit, 20 g de réactif de Llyod, 10 g de sulfate de cuivre, 20 g d'hydroxyde de calcium. Agiter dans un flacon bien bouché.

Conservation quelques semaines.

- Solution-étalon :

= solution mère de trioléine à 1 % dans l'isopropanol

Conservation 3 mois au réfrigérateur.

= Préparer, par dilution dans l'isopropanol, des solutions filles dont les concentrations vont de 50 à 300 mg de trioléine pour 100.

Assez bonne conservation en flacons bien bouchés, au réfrigérateur.

Extraction.

Verser exactement 9, 5 ml d'isopropanol dans un tube à bouchon vissé.

Pipetter 0, 5 ml de plasma ou sérum. Les verser goutte à goutte dans l'isopropanol. Fermer le tube. Porter 30 secondes au Tubmix.

Ajouter 2 g de mélange zéolite. Refermer le tube. Porter à nouveau 30 secondes sur l'agitateur.

Puis, 30 minutes de repos en retournant les tubes toutes les 10 mn.

Centrifuger.

Verser les extraits dans les godets du Sampler II.

Pour les étalons, opérer de même mais on ajoute 9 ml d'isopropanol puis 0, 5 ml d'eau et 0, 5 ml de solution étalon.

Les chiffres sont identiques à ceux donnés par la méthode de van HANDEL et ZILVERSMIT.

Nous avons ainsi fait le tour des méthodes directes de détermination de la triglycéridémie.

D'autres méthodes d'étude modernes peuvent être utilisées :

- chromatographie en phase gazeuse
- chromatographie en couche mince.

DETERMINATION CHIMIQUE APRES FRACTIONNEMENT

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (5)

Elle permet d'étudier la composition centésimale en acides gras des triglycérides.

Elle nécessite un appareillage particulier, également la transformation des acides gras destriglycérides extraits et saponifiés en esters méthyliques volatils pour qu'ils puissent être transportés dans la phase gazeuse.

C'est une méthode précieuse mais de peu d'intérêt cependant pour classer les hyperlipémies.

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Elle permet de mettre en évidence sur plaque la totalité des composés lipidiques du sérum sanguin. Elle rassemble en une seule opération la phase séparatrice et la phase contrôle.

- Technique selon BISERTE et Collaborateurs (6) -

Principe :

Une couche adsorbante de faible épaisseur est déposée sur un support solide, plaque de verre, d'aluminium ou de plastique. Celle-ci est placée dans une enceinte fermée, saturée, du solvant de migration choisi. On laisse celui-ci progresser par capillarité sur la couche mince.

Matériel :

- feuilles d'aluminium C C M de gel de silice F 254 de 20 x 20 - épaisseur de la couche 0,25 mm.

- cuves de développement en verre, de Sthal pour plaque 20 x 20 à couvercle rodé.

- applicateur capillaire [x] que nous avons mis au point, réalisé en verre ou en téflon, il permet un dépôt régulier et rapide en bande, de l'extrait sur la plaque - volume de 5 à 50 µl.

- sèche-cheveux pour le séchage des spots au moment du dépôt et des plaques après migration.

Mode opératoire :

Migration. On opère sur un extrait lipidique total du sérum, selon DELSAL, par exemple :

On dépose sur la plaque sur 2 cm de large des spots contenant 1 à 5 mg de lipides, à 2 cm du bas de la plaque.

Des substances de référence : tripalmitine, cholestérol, acide palmitique, palmitate de cholestérol sont également déposés.

Deux plaques sont préparées :

- l'une migre dans le milieu

éther de pétrole	éther	acide acétique
90 volumes	10 volumes	1 volume

pour les lipides neutres

- l'autre, dans le milieu

chloroforme	méthanol	eau
65 volumes	25 volumes	4 volumes

pour les phosphatides.

Révélation.

De nombreux procédés plus ou moins spécifiques de chaque fraction peuvent être utilisés :

- pulvérisation de Rhodamine 6 G à 1 %.

La lecture se fait en lumière de Wood sous forme de taches fluorescentes jaunes.

---

[x] CORNIOU, rue du Lieutenant Chauré, PARIS 20è.

On peut aussi placer la plaque dans une enceinte saturée de vapeurs d'iode, par adjonction à la cuve d'un cristallisoir rempli d'iode métalloïdique.

Les diverses fractions lipidiques sont révélées sous forme de taches marron clair.

On individualise nettement sur la plaque, successivement :

- sur la ligne de départ
  n'ayant pas migré dans le solvant les phosphatides :
  grosse ligne brune
- une très mince ligne de monoglycérides
- une ligne brune importante donnée par le cholestérol
- une ligne très fine de N E F A
- une importante ligne brune de triglycérides
- tout en haut du chromatogramme : les esters du cholestérol

Sur une deuxième plaque non révélée, les fractions révélées peuvent être clivées et soumises à un dosage spécifique sur un extrait très purifié au préalable.

Cette méthode est très élégante et simple.

Nous en avons fini avec l'étude des fractionnements chimiques de l'extrait lipidique du sérum sanguin, pour aborder l'étude des moyens physiques de fractionnement.

II - METHODES PHYSIQUES DE FRACTIONNEMENT -

Ainsi que nous l'avons vu, les lipides parfaitement insolubles dans l'eau ne sont transportés dans le milieu intérieur que grâce aux liaisons qui les attachent à certaines protéines du sérum ; aussi, l'un des points les plus importants de l'étude des hyperlipémies triglycéridiques sera-t-il l'examen des lipoprotéines circulantes.

Celles-ci pourront être appréhendées grâce à leurs propriétés physiques toutes particulières :

- Densité - méthode de référence de l'ultracentrifugation
- charge électrique spécifique, permettant un fractionnement par électrophorèse - La copule lipidique permet ensuite la mise en évidence.
- fractionnement physicochimique (BURSTEIN)
- immunologie
- propriétés optiques particulières de certaines lipoprotéines.

Nous commencerons par la méthode de référence : l'ultracentrifugation (11)

- ULTRACENTRIFUGATION -

Nous n'en avons pas la pratique, elle nécessite un appareillage coûteux, de manipulation longue et délicate.

La densité des lipoprotéines toujours $<$ à 1,20 est, en effet, bien inférieure à celle des autres protéines toujours supérieure à 1,3.

Les lipoprotéines ont des densités variables, fonction de leur teneur en lipides.

Les différences de densité ne sont pas très grandes, allant de 1,006 à 1,20. Une centrifugation telle que celle pratiquée au laboratoire journellement, à 5000 à 6000 t/mn, n'apporterait aucun fractionnement. Mais les ultracentrifugeurs peuvent atteindre des accélérations beaucoup plus puissantes allant à 100.000 fois celle de la pesanteur 100.000 G.

Mais deux techniques d'ultracentrifugation existent et se complètent :

Ultracentrifugation préparative.

L'ultracentrifugation préparative d'abord, pour séparer les fractions qui seront soumises ensuite à l'ultracentrifugation analytique.

On opère en tubes, une centrifugation dans des milieux liquides de densité progressivement croissante. Les densités ne sont pas choisies arbitrairement mais on se guide sur des travaux antérieurs. On s'attache à des densités donnant un fractionnement intéressant. Les fractions isolées sont décantées, recueillies et soumises ensuite à l'ultracentrifugation analytique.

Ultracentrifugation analytique

(voir schéma page 29)

Le déplacement optique est suivi par enregistrement optique de l'absorption U V a des temps déterminés à travers une fenêtre de quartz pratiquée dans le rotor.

Ces clichés permettent de calculer la vitesse de déplacement ou Sf de chaque famille. Celle-ci est d'autant plus grande que la teneur en lipides est plus élevée.

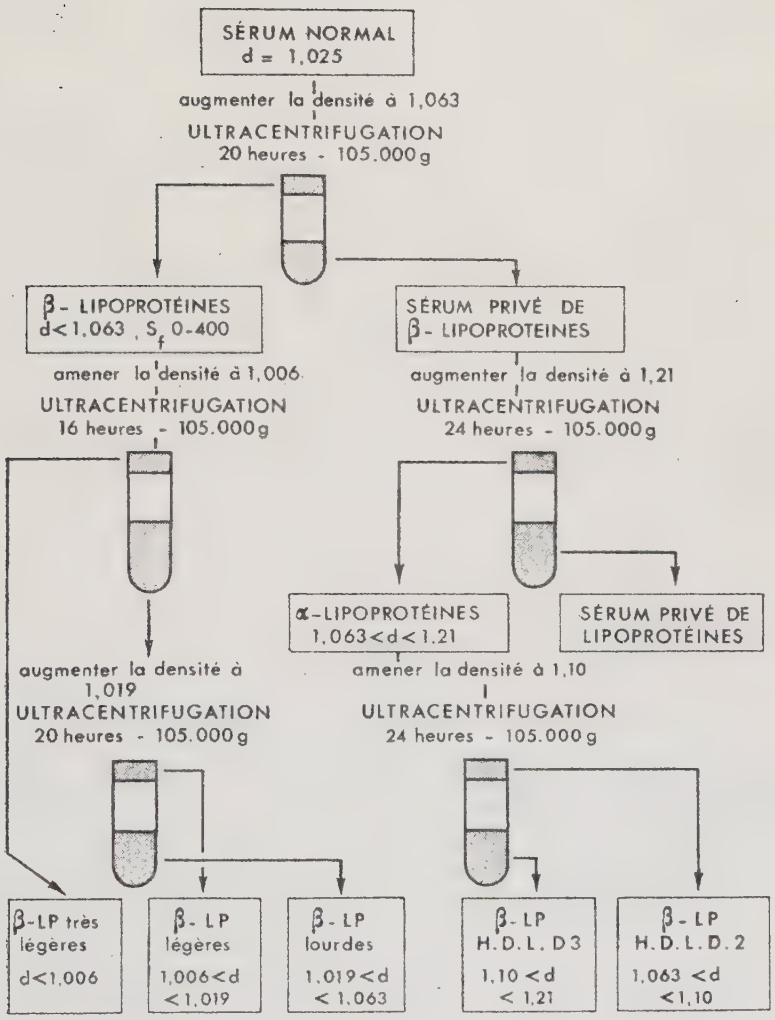


Schéma de séparation des lipoprotéines sériques

par ultracentrifugation fractionnée.

(Selon CANAL et ROUFFY)

Résultats fournis par la méthode d'Ultracentrifugation

préparative	analytique
1. Lipoprotéines lourdes	high density
haute densité entre 1,21 et 1,063	lipoprotéines
ceci recouvre les lipoprotéines	HDL_1 HDL_2 HDL_3
2. Lipoprotéines légères	Low density
β lipoprotéines lourdes	Lipoprotéines
d = 1,019 à 1,063	LDL
	Sf 0 à 12
β lipoprotéines légères	LDL
d = 1,006 à 1,019	Sf = 12 à 20
β lipoprotéines très légères	Very LDL
d < 1,	Sf = 20 à 400
pré β	
Lipomicrons	Sf > 400
Chylomicrons	

La composition chimique de ces diverses fractions est connue.

	α lipoprotéines moyennes	β lipoprotéines moyennes
Protéines	50 %	22 %
Cholestérol	18 %	45 %
phospholipides	30 %	23 %
triglycérides	2 %	10 %

	pré β lipoprotéines	Chylomicrons
protéines	10 %	traces 1 %
cholestérol	15 %	7 %
phospholipides	15 %	7 %
triglycérides	60 %	85 %

(Selon CANAL & ROUFFY dans "Problèmes actuels de biochimie appliquée sous la direction de M. L. GIRARD.)

Nature des protéines liées.

Les lipoprotéines liées H D L ou lipoprotéines lourdes.

Nous avons vu leur composition centésimale en lipides. La copule protéique, peptide A à propriété antigénique, ou apoprotéine, a été isolée par extraction par l'alcool éthylique à 0° C.

On y reconnaît plusieurs sous-unités de poids moléculaire compris entre 23 et 32.000, associées en nombre différent pour donner HDL_1 HDL_2 HDL_3.

La composition en acides aminés ne montre pas d'anomalie par rapport aux autres protéines du sérum, hormis une certains pauvreté en acides aminés soufrés. Le taux des acides aminés apolaires acides ou basiques n'est pas particulier. La liaison lipides-protides semble devoir trouver son explication dans la structure spatiale du complexe.

Elles sont synthétisées dans le foie. Elles transportent les phospholipides principalement.

La présence de protéine ayant les caractères antigéniques du peptide A dans les β lipoprotéines très légères et les chylomicrons indiquerait une participation possible des α lipoprotéines au maintien en solution des lipides exogènes et des triglycérides endogènes.

Il faut, en effet, bien réaliser que si toutes nos méthodes d'étude analytique tendent à montrer ces lipoprotéines séparées les unes des autres, elles sont, en fait, dans le sérum toutes ensemble et il y a des interactions certaines entre elles.

Les β lipoprotéines lourdes Sf 0 - 12 : lipoprotéines légères.

C'est la forme de transport du cholestérol et la fraction la plus importante chez le sujet normal. La copule protéique séparée de la fraction lipidique s'insolubilise contrairement à celle des α lipoprotéines. De ce fait, la masse moléculaire n'est pas connue. La composition en acides aminés semble proche de celle des autres protéines du plasma. Elles n'ont pas une taille suffisante pour diffracter la lumière et leur augmentation n'a mène pas de lactescence du plasma.

Les βlipoprotéines légères Sf = 12 à 20. : très proches des précédentes, elles comportent un peu plus de triglycérides.

Les βlipoprotéines très légères Sf = 20 à 400. : quantitativement peu importantes chez le sujet normal. Elles peuvent subir des accroissements considérables en pathologie.

L'analyse de leur copule protéique montre la présence de plusieurs acides aminés en position N terminale. Ceci donne à penser que plusieurs chaînes peptidiques différentes y figurent simultanément. Ceci est corroboré par le fait qu'aux essais d'isolement par les solvants à basse température, elle conduit à deux fractions protéiques :

- l'une, dénaturée, insolubilisée après délipidation ;
- l'autre, restant soluble et semblant renfermer le composant antigénique du peptide A et des αlipoprotéines.

Les chylomicrons : visibles au microscope fond noir - de grand diamètre, diffusent la lumière, responsables de la lactescence postprandiale avant d'être captés par le foie et les tissus.

Les lipomicrons : plus petits, assez proches des βlipoprotéines très légères, sont synthétisés par le foie soit à partir des graisses exogènes, soit à partir des glucides. Ils sont captés par les tissus.

Mais l'ultracentrifugation est une méthode d'exception.

Or, le tableau que nous venons de montrer indique l'intérêt qui s'attache à fractionner les lipoprotéines puisque l'on connaît celles qui sont porteuses des triglycérides et d'où viennent les triglycérides qu'elles transportent. Aussi, est-ce à l'électrophorèse que nous demanderons de les différencier.

- ELECTROPHORESE -

La molécule lipoprotéique présentant des groupements polaires se déplace sous l'action d'un champ électrique.

L'électrophorèse en veine liquide selon TISELIUS ne permet pas de différencier les lipoprotéines des autres protéines de mobilité identique car elle ne permet pas la mise en évidence de la copule lipidique. Pour cette raison, on a cherché à utiliser les supports solides où il était possible de fixer les fractions après passage du courant et de révéler les lipides liés aux protéines.

Les premiers essais calqués sur le fractionnement électrophorétique des protéines utilisèrent le papier.

Dans notre étude, nous suivrons la chronologie des faits en présentant successivement les techniques que nous avons utilisées. :

1. Electrophorèse sur papier
2. Electrophorèse sur acétate de cellulose
3. Retour au papier avec le fractionnement indiqué par LEES et HATCH, en milieu albumineux, qui détache les pré β lipoprotéines.
4. Passage à l'électrophorèse sur agarose qui nous paraît allier actuellement les avantages d'une technique utilisable sur des séries de détermination et une grande finesse de résolution :

- reproductibilité,
- se prête bien au quantitatif.

Matériel.

- cuves Elphor
- intégraphe Elphor.

1. Electrophorèse sur papier -

a) Méthode de GRASSMANN et HANING :

Durant de longues années, c'est cette technique que nous avons utilisée en cuve Elphor, en tampon de pH 8,6 et de force ionique 0,1.

Migration : 16 heures - Coloration au noir cerol B.

Réactifs :

- Tampon :

acétate de sodium R. P.	6,80 g
véronal	1,84 g
véronal sodique	10,30 g
eau distillée q. s. p.	1000 ml

- noir cérol :

0,10 G de noir cerol B Kuhlmann sont dissous dans 5 ml d'acétone. La solution est ensuite complétée à 200 ml avec de l'alcool à 50°.

- papier Schleicher et Schüll.

Migration :

On dépose 20 mm3 de sérum du côté cathodique.

On laisse migrer 16 h à 150 volts.

On sèche rapidement les bandes pour éviter toute diffusion.

Coloration :

Les bandes sont plongées pendant une heure à la température du laboratoire dans la solution alcoolique de noir cérol B. On essore les bandes entre des feuilles de papier filtre. On les rince une fois à l'alcool à 50°, on les essore, on les sèche.

L'estimation quantitative se fait par lecture à l'intégraphe Elphor.

Résultats :

On reconnaît deux fractions :

- une fraction α égale à 25 % environ
- une fraction β égale à 75 %

et une traînée importante de chylomicron.

Inconvénients :

Les colorations vieillissent mal pour l'archivage et le complexe β-lipoprotéine n'est pas décomposé. L D L et V L D L restent groupées, les lipoprotéines à triglycérides ne sont pas mises en évidence.

b) Méthode de LEES et HATCH :

Aussi, un gros progrès fut-il fait grâce à la méthode de LEES et HATCH d'électrophorèse sur papier en tampon albumineux. (30)

En effet, par suite de la présence d'albumine, les effets d'adsorption du papier sont partiellement éliminés.

Réactifs :

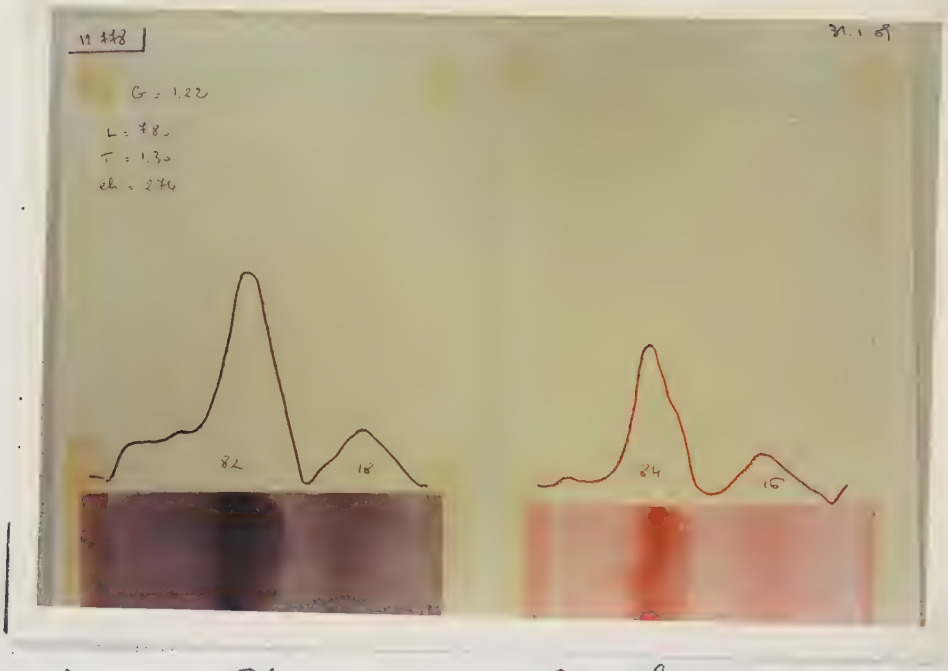
Tampon pH 8,6 de force ionique 0,1

acétate de Na R. P.	6,80 g
véronal	1,84 g
véronal sodique	10,30 g
E D T A, sel sodique	0,37 g
albumine humaine exempte de caprylate	10,- g
eau distillée q. s. p.	1000 cm^3

Colorant : Oil Red O

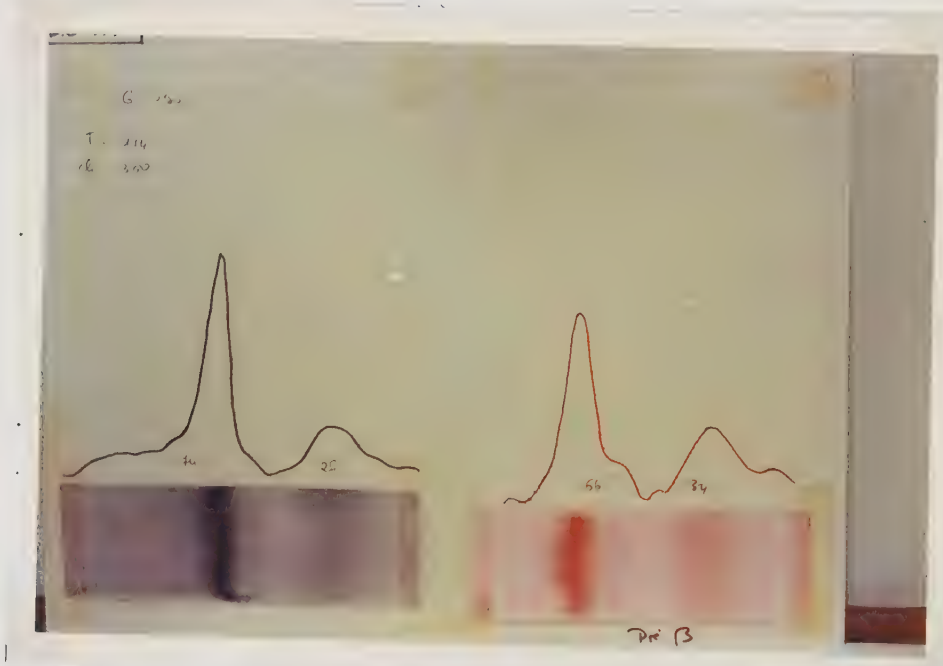
0,40 G de colorant dans un litre d'alcool à 60° sont portés à l'ébullition, sous réfrigérant à reflux, pendant deux heures, avec agitation magnétique.

Migration : se fait dans les mêmes conditions que dans la technique précédente.



a) noir Cérol b) Lees et Hatch

Broad β



a) noir Cérol b) Lees et Hatch

Pre β

Coloration :

Les bandes séjournent 18 heures dans le colorant maintenu à 37°. On essore. On lave abondamment à l'eau courante. On sèche. La conservation est fort bonne.

Surtout, on individualise les β lipoprotéines légères qui sont arrachées du bloc β.

On voit :

- une fraction α
- une fraction β
- une fraction pré β

dans les cas pathologiques :

- une fraction intermédiaire entre β et pré β : les broad β.

Inconvénients :

Le prix de revient élevé du réactif albumineux.

Le fait que le dégagement gazeux qui se produit aux électrodes en milieu albumineux amène la formation de mousse qui peut aboutir à leur polarisation.

Cette technique a, cependant, longtemps satisfait : c'est elle qui fut à l'origine de la classification de FREDERICKSON dont nous parlerons bientôt.

Sur le papier, cependant, certaines lipoprotéines de Sf voisin de 400 se comportent comme des chylomicrons. Aussi, a-t-on essayé d'autres supports.

2. Electrophorèse sur acétate de cellulose (12)

Ce support ne gêne pas la migration des lipoprotéines comme le fait le papier. Mais un obstacle est constitué par le fait que l'acétate de cellulose a une grande affinité pour les colorants des lipides, ce qui rendrait la lecture des bandes à peu près impossible si l'on n'arrivait, en les traitant à la soude, à leur faire perdre leur affinité tinctoriale. Mais ce traitement est délicat et ne va pas sans détériorer quelque peu le support.

Nous donnerons la technique publiée par M. CARON, J. L. BARBIER et F. GUIGNIER, dans les feuillets de biologie n° 56, de septembre 1970.

Réactifs :

Bande cellogel

Tampon :

véronal sodé	10,30 g
véronal	1,84 g
Tris	7,20 g
E D T A	0,685 g
eau q. s. p.	1000 cm^3

Colorant : rouge S L 1038 -

500 mg sont dissous dans 700 ml d'alcool méthylique. On complète à 1000 ml avec de l'eau distillée. On porte 15 minutes à l'ébullition à reflux. On laisse refroidir. Le colorant est filtré extemporanément.

Technique :

Les membranes conservées au frigidaire, humides, sont immergées 10 minutes dans le tampon.

On les essore entre feuilles de papier filtre.

On dépose 1 µl de sérum à 4 cm du bord cathodique.

On fait migrer 30 minutes à 200 volts.

On plonge les bandes sur leur support dans l'acide acétique à 2,5 pour mille, pendant 5 minutes.

On prépare extemporanément la solution d'hydrolyse :

50 ml de soude à 5 %)
50 ml de méthanol) on mélange

On immerge la bande et agite lentement 8 mn.

On plonge alors immédiatement dans le colorant maintenu à 40°.

On laisse agir 35 à 40 minutes.

On rince abondamment à l'eau 5 minutes.

On immerge une minute dans le formol à 30 %.

On plonge la bande quelques minutes dans la glycérine à 7 %.

Lire au photomètre à 530 mμ .

Résultats :

On voit : α lipoprotéines
pré β lipoprotéines
β lipoprotéines
chylomicrons qui n'ont pas migré

Avantage :

Rapidité d'obtention.

Inconvénients :

- difficulté d'obtenir des colorations très reproductibles
- et de faire du quantitatif dans de bonnes conditions.

Venons-en à présent au support qui a toutes nos préférences :

3. Electrophorèse sur agarose - Méthode de NOBLE modifiée.

L'agarose, dérivé purifié de la gélose, donne un gel à forte teneur en eau qui permet une excellente migration de toutes les particules chargées électriquement. La transparence du gel se prête de plus très bien à une photométrie quantitative et permet les révélations immunologiques.

Nous donnerons la technique adoptée dans le Laboratoire du C. I. E. M. par notre équipe sous la direction du Docteur Colas BELCOUR (15). Cette technique nous donne toute satisfaction.

C'est la méthode de NOBLE (33), adaptée à notre appareillage.

Matériel :

- Cuves Elphor
- Integraphe Elphor
- lames de verre, optiquement planes, de 20 x 4.

Réactifs :

1. Agarose x

Il y a plusieurs qualités d'agarose. Or, il convient d'obtenir un gel se liquéfiant vers 41° C, afin de pouvoir manipuler un gel assez résistant d'une part, fondant d'autre part à une température assez basse pour ne pas amener de dénaturation des lipoprotéines du sérum.

Agarose A 45 1 partie

A 37 3 parties.

Préparation du gel : en deux temps :

a) Agarose 1,60 g
Eau distillée 100 ml
Dissoudre au bain-marie bouillant et laisser refroidir ensuite vers 52° C.

b) Albumine humaine 2 g
Solution tampon 100 ml
à pH 8,6
Amener à 50° C environ.
Mélanger a + b à parties égales, à 50° C.

2. Colorant :

a) Solution stock (Noir au gras (Biolyon 2 g
(Alcool à 60° 1 litre.
On mélange sur agitateur magnétique environ 1 h ; on laisse reposer une nuit au réfrigérateur, on filtre et conserve à 4° C.

---

x Industrie biologique Française : 35 quai du Moulin de Cage, Gennevilliers.

b) Avant l'emploi, on dilue au demi avec de l'alcool à 60°.

3. Tampon pH 8,6

véronal 1,84 g
véronal sodique 10,24 g
eau distillée qsp 1000 ml

On ajuste le pH à 8,6 avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique.

Conservation : une semaine.

Technique :

Préparation des lames -

On coule le gel liquéfié à 50° et résultant du mélange à parties égales de la solution d'agarose et de la solution d'albumine dans le tampon, sur les plaques optiquement planes de l'Intégraphe

Il faut environ 12 ml par lame.

On laisse refroidir à température ambiante.

On porte quelques minutes au frigidaire.

On fait, à 7 cm d'une extrémité, une gouttière tracée dans la gélose à l'aide d'un emporte-pièce de 28 mm x 2 mm.

On pose les lames sur le chevalet de la cuve Elphor par ailleurs remplie de tampon. Le pont entre les bacs à électrodes et les lames est assuré par un papier amianté C O F R A M préalablement imprégné de tampon.

Ensememcement des lames -

Dans un tube à hémolyse, mettre :

plasma 0,4 ml) amenés à 40° C ;
agarose = 0,2 ml) bien mélanger
+ tampon

On dépose 80 µl de ce mélange dans la rigole.

On laisse migrer 4 heures sous 220 volts.

Chaque cuve renferme un témoin sérum additionné de quelques gouttes de bleu de bromophénol et qui visualisera la position du front des albumines.

On arrête la migration lorsque l'albumine a parcouru une distance d'environ 7 cm.

Coloration :

On met les plaques côte à côte bien à plat durant 1 heure dans un bain d'acide acétique à 5 %.

On retire ensuite les lames, on les essuie soigneusement au dos et on les les dépose bien à plat, dans une étuve sèche règlée entre 70 et 80° C durant une nuit.

Le lendemain, les lames sont immergées 6 heures dans le colorant dilué, lavées à l'eau courante et séchées.

On effectue la lecture à l'intergraphe Elphor.

Résultats :

Dans ces conditions, on obtient un fractionnement parfaitement reproductible - chiffrable avec précision par passage des plaques au densitomètre intégrateur intergraph Elphor - facile à conserver en archives.

On voit, chez le sujet normal, par vitesse de migration croissante :

- une tache bleue : la plus importante des βlipoprotéines lourdes. Ce sont les lipoprotéines riches en cholestérol,

- puis, une tache plus discrète, formée des :
  pré βlipoprotéines
  β lipoprotéines très légères, riches en triglycérides

- enfin, une tache peu importante, nettement plus rapide, formée des lipoprotéines de haute densité αlipoprotéines.

Zones normales approximatives :

α lipoprotéines	10 à 30 %
pré β lipoprotéines	5 à 25 %
β lipoprotéines	50 à 75 %.

Fractionnement normal

Sérum lactescent préβ + chylomicrons

βlipopro.	44 %	Lipides	16,10g p.10
préβlipopr.	43 %	Trigl.	9,20g p.10
αlipopro.	13 %	Chol.	2,90g p.10

Broadβ + chylomicrons

Bloc βlipopro.	82 %
αlipopro.	18 %

Préβ lente + préβ rapide

βlipopro.	48 %	Lipides	7,80g p.1
préβlipopro.	25 %	Trigl.	1,12g p.1
αlipopro.	27 %	Chol.	2,88g p.1

Préβ avec hyper-cholestérolémie

βlipopro.	39 %	Lipides	15,00g p.1
préβlipopro.	51 %	Trigl.	4,88g p.1
αlipopro.	10 %	Chol.	4,28g p.1

Préβ avec hyper-cholestérolémie

βlipopro.	39 %	Lipides	8,70g p.1
préβlipopro.	50 %	Trigl.	3,08g p.1
αlipopro.	11 %	Chol.	2,66g p.1

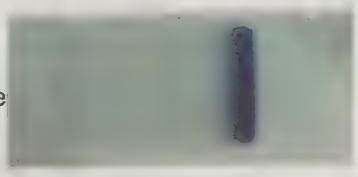
Sérum trouble sans chylomicrons Préβ très aug-mentés

β lipopro.	13 %	Lipides	23,50g p.1
préβ lipopro.	75 %	Trigl.	14,60g p.1
αlipopro.	12 %	Chol.	3,44g p.1

Sérum lactescent Broad β

β lipopro.	28 %	Lipides	22,80g p.1
Broad β	52 %	Trigl.	14,50g p.1
préβ lipopro.	17 %	Chol.	5,10g p.1
αlipopro.	3 %		

Hypercholestérolémie



En pathologie, peuvent apparaître chez le sujet à jeun :

- des chylomicrons restés dans la rigole de départ
- une fraction qui peut devenir prédominante et de vitesse intermédiaire à β et préβ correspondant aux broad β de la méthode de LEES et HATCH.

NOBLE et HATCH (34) ont récemment présenté une étude comportant l'ultracentrifugation, l'électrophorèse sur papier selon LEES et HATCH, et sur agarose. Ils ont analysé les courbes d'enregistrement photométrique des fractionnements électrophorétiques et distingué 2 fractions pré β :

une pré β lente, slow pré β parfois distincte mais souvent peu arrachée aux lipoprotéines

une pré β rapide, fast pré β ,augmentée par un repas riche en graisse.

Le coefficient : Ils ont établi une corrélation existant entre Sf et fractions électrophorétiques.

	β Sf = 0 à 20	pré β Sf = 20 à 400	β + pré β Sf = 0 - 400	α H D L
Coefficient de Corrélation : agarose	083	094	079	076
Coefficient de Corrélation : papier	085	088	076	076

De ceci, il résulte la très bonne séparation opérée sur agarose pour les pré β lipoprotéines si importantes à séparer puisqu'elles sont le support des triglycérides.

Avant d'envisager les conclusions pratiques à tirer de ce travail, il nous reste à envisager d'autres méthodes physiques d'étude des lipoprotéines du sérum et, singulièrement, des lipoprotéines porteuses de triglycérides.

- SEPARATION PAR GRADIENT de DENSITE -

GORDIS (24) a proposé l'étude des particules lipidiques des sérums lactescents par flottation en milieu de densité connue.

La polyvinylpyrrolidone en solution à 5 % entraîne la floculation des particules graisseuses d'un sérum lactescent sans toucher aux lipoprotéines solubles.

GORDIS a indiqué un test assez délicat au moyen d'une colonne à gradient de densité.

BIERMAN (4) a donné un protocole plus simple que nous allons voir.

Réactif :

polyvinylpyrrolidone sèche Prolabo	3 g
eau distillée	100 ml

Technique :

Dans un tube à essais, mettre 10 ml de la solution P.V.P.

Introduire avec précaution 0,5 ml de plasma au fond du tube.

Laisser 16 heures à 37° C.

Résultats :

- plasma normal : surnageant limpide
- Couche laiteuse à la surface de la PVP, particules primaires : chylomicrons
- surnageant trouble : particules secondaires.

- PROPRIETES OPTIQUES du SERUM -

Il y a longtemps que l'on connaît les hyperlipémies essentielles à sérum laiteux.

Ceci montrait l'intérêt qu'il y avait - avant de se livrer à des examens chimiques ou physicochimiques complexes à regarder l'aspect du sérum - afin de juger de l'état des "humeurs" selon Molière.

1. La mesure de la densité optique du sérum est faite dans le visible, au photomètre en cuve de 1 cm contre un blanc d'eau distillée à 580 mμ en absorption.

Les chiffres normaux sont inférieurs à 0,100 de densité optique.

Ils se trouvent augmentés principalement dans l'hyperchylomicronémie et dans les hypertriglycéridémies, mais la méthode est peu sensible.

2. Méthode néphélémétrique de mesure de la chylomicronémie, mise au point par P. METAIS, A. BACH et J.M. ULRICH (32).

Ceux-ci ont mis au point une méthode de mesure de diffusion de la lumière par le sérum dans le but d'effectuer des épreuves d'hyperlipémie par mesure du taux des chylomicrons circulants.

La méthode classique de comptage des chylomicrons sur fond noir, longue, délicate, ne se prêtait pas aux mesures en série, ce que permet la mesure photométrique de la lumière diffusée.

Un problème d'étalonnage se pose en néphélémétrie. Les auteurs l'ont résolu en prenant un étalonnage arbitraire avec une suspension préparée extemporanément de sulfate de baryum.

. Solution de sulfate de sodium 0,05 M dans le glycérol.

Dans le minimum d'eau froide, faire dissoudre 1,61 g de sulfate de sodium 10 OH_2 - Compléter à 100 ml avec du glycérol.

. Solution de chlorure de baryum 0,05 M dans le glycérol.

Faire dissoudre dans le minimum d'eau 1,12 g de chlorure de Ba 2 OH_2 - Compléter à 100 ml avec du glycérol.

. Suspension standard de sulfate de Ba, préparée par mélange extemporané en volume égal des deux solutions précédentes. Agiter longuement pour obtenir une suspension homogène. Les solutions de base sont visqueuses et leur mélange est laborieux. De plus, l'expérience montre que la reproductibilité du pouvoir de diffusion du mélange est approximative.

La grande amélioration sur la méthode précédente venait du choix de mesure de la lumière diffusée et non plus transmise, en utilisant un fluorimètre.

3. Travaux personnels.

Une étude très complète de la diffusion de la lumière par le sérum a été faite par M. C. STONE et J. M. THORP (37).

Ils ont montré que, dans le sérum privé par filtration sélective sur membrane de ses chylomicrons, la lumière diffusée suivait une loi mathématique simple, en rapport avec le taux des triglycérides circulants. En effet, les β lipoprotéines légères porteuses des triglycérides ont une taille moléculaire suffisante pour provoquer la diffusion de la lumière visible.

Nous avons vérifié ces assertions et nos travaux ont corroboré leur thèse (36).

Nous avons pour cela utilisé l'appareil spécialement mis au point par STONE et THORP :

le micronéphélomètre de THORP [x]

Il s'agit d'un néphélomètre de diffusion extrêmement sensible. La lumière incidente, fournie par une lampe à filament, passe à travers un filtre rouge, pénètre par le fond du tube de mesure (tube calibré).

La lumière diffusée par l'échantillon est reçue par deux cellules photoconductrices à sulfate de cadmium, placées à 90° du faisceau incident. La réponse des cellules est reçue par un galvanomètre gradué de 0 à 100.

Un potentiomètre permet de déplacer la zone de lecture.

---

x Scientific furnishing Limited Electronic Division.

Importateur en France : Paris-Labo, rue du Cardinal Lemoine, PARIS.

Etalonnage.

Une grande difficulté de la néphélémétrie de diffusion est l'obtention d'étalonnages reproductibles.

La solution a été trouvée par l'emploi comme référence de deux suspensions étalons de polystyrène latex. Tout repose donc sur ces deux étalons fournis avec l'appareil.

C'est par rapport à eux que THORP a construit les abaques qui permettent de passer du chiffre du galvanomètre au taux des triglycérides.

Leur conservation est très bonne entre 4° et la température ambiante, et ne nécessite pas de précaution particulière. Il fayt, cependant, prendre grand soin de ne pas rayer les tubes et de les changer dès qu'ils présentent des rayures.

Les tubes utilisés pour la détermination doivent avoir le même calibre que les tubes étalons. Ils doivent être isotropes et avoir un fond homogène ne déformant pas l'image du filament de la source lumineuse lorsqu'on les fait tourner autour de leur axe.

Mode opératoire.

Laisser chauffer l'appareil 15 minutes avant le début des mesures. On opère sur sérum obtenu par centrifugation soigneuse et décantation ou mieux double centrifugation. Il est nécessaire d'attendre, avant de commencer les opérations, une coagulation bien complète pour éviter la présence de fibrine.

Le sérum est dilué au 1/10 : 1 cm^3 de sérum
9 cm^3 de sérum physiologique.

Mélanger par retournement sans agitation violente pour éviter mousse et bulles.

Eléments causant la diffusion dans le sérum.

1) la lumière incidente.

2) les triglycérides lipoprotéines légères, selon van HANDEL et ZILVERSMIT.

3. protéines anormales, floculées, cryoglobulines, fibrine.

4. chylomicrons.

Il est indispensable d'éliminer protéines et chylomicrons. Ces derniers ont, en effet, un pouvoir de diffusion incomparablement plus fort que les triglycérides et, en faible quantité, perturbent grandement la mesure de la triglycéridémie.

Un exemple : un sérum trouble prélevé après repas donne :

a) par néphélométrie	sérum dilué			
	- filtré :	17,40 g	triglycérides	p. 1000
	- non filtré :	4,16 g	"	"
b) dosage chimique selon van Handel & Zilversmit	sur sérum non filtré :	4,66 g	"	"

Filtration.

Le sérum soit pur, soit mieux dilué au 1/10 dans le sérum salé à 9 p. 1000, est filtré sur membrane ultra filtrante en acétate de cellulose à l'aide d'un dispositif très simple sous pression. La pression est très facilement obtenue en introduisant le liquide à filtrer dans le dispositif à l'aide d'une seringue en verre ou en plastique (membrane Sartorius Gottingen MF 14 à pores de diamètre inférieur à 0,1 µ) x

(Voir ce dispositif page 50)

---

x Labo Moderne, 6, rue de la Vrillière, PARIS 1er.

		& filtré	& non filtré
1	0,95	0,80	1,38
2	1,28	1,05	1,34
3	1,08	0,91	1,12
4	0,70	0,92	3,88
5	0,80	0,57	0,73
6	1,07	1,05	1,34
7	0,90	0,84	1,01
8	0,26	0,25	
9	1,60	1,45	2,81
10	0,70	0,94	1,73
11	0,46	0,57	0,60
12	1,62	1,42	2,35
13	1,18	1,05	1,34
14	0,74	0,67	0,77
15	2,24	1,73	3,32
16	0,62	0,67	1,73
17	1,10	0,98	1,31
18	1,47	1,34	2,83
19	2,88	2,17	2,72
20	1,76	1,31	2,39
21	1,18	0,80	1,16
22	0,70	0,63	1,34
23	0,54	0,41	0,50
24	0,84	0,84	0,98
25	1,24	1,31	
26	1,34	1,05	1,50
27	1,32	1,12	1,42
28	0,88	0,80	0,98
29	0,50	0,63	1,23
30	0,94	0,84	1,05
31	1,26	1,12	1,34
32	0,66	0,63	0,98
33	2,12	2,17	2,63
34	2,16	2,13	2,81
35	0,50	0,70	0,98
36	0,38	0,47	0,57
37	0,50	0,63	1,09
38	0,70	0,70	1,09
39	2,04	2,17	2,04
40	0,70	0,70	0,89
41	0,68	0,84	0,87
42	0,60	0,67	0,70
43	1,50	1,73	2,50
44	2,40	2,50	4,85
45	0,96	0,89	1,20
46	0,60	0,63	1,05
47	0,72	0,80	1,65
48	0,66	0,57	2,38
49	0,44	0,50	0,77
50	1,90	1,57	1,97
51	1,50	2,09	2,81
52	1,12	1,12	1,23
53	0,70	0,63	0,70
54	0,64	0,50	0,57
55	0,78	0,70	0,91
56	1,56	1,12	1,71
57	0,50	0,47	0,63
58	0,48	0,50	0,84
59	1,00	0,94	2,21
60	1,12	0,98	2,68
61	0,54	0,73	1,12
62	0,70	0,63	0,80
63	0,74	0,63	0,80
64	0,84	0,57	0,73
65	0,72	0,60	0,94
66	1,06	1,01	1,57
67	0,83	0,80	1,09
68	1,76	1,61	2,01
69	0,86	0,73	1,01
70	0,66	0,63	0,77

La dilution est versée dans le corps de la seringue, préalablement ajusté à l'appareil de filtration.

Le piston est introduit. Une pression modérée est faite avec le pouce. Les deux premiers cm^3 sont rejetés. On reçoit les 3 cm^3 suivants dans le tube de mesure.

Il est recommandé de travailler à une température de 20° C $\pm$ 2° C.

Chaque mesure est faite comparativement à l'étalon le plus proche du dosage.

L'abaque de THORP permet, à l'aide d'un simple calcul, d'obtenir le taux de triglycérides.

Il est ainsi possible d'obtenir en 3 minutes un taux de triglycérides, au lieu des quelques heures de manipulation que représentent les méthodes classiques.

Les pigments biliaires et l'hémoglobine ne gênent pas le dosage tant que leur concentration n'affaiblit pas dans de trop fortes proportions la lumière incidente.

Notre essai de la technique de STONE et THORP a porté sur 70 sérums.

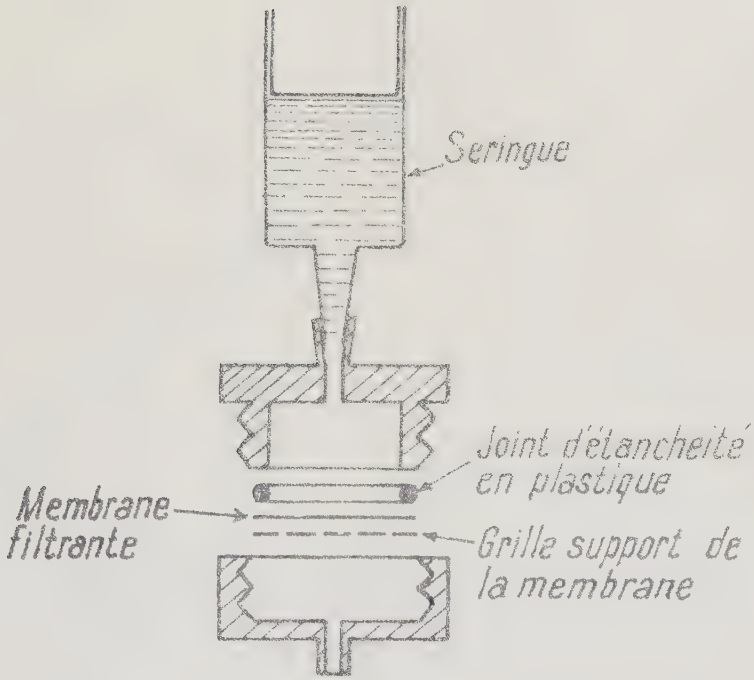
Pour chacun d'eux, les triglycérides ont été estimés par :

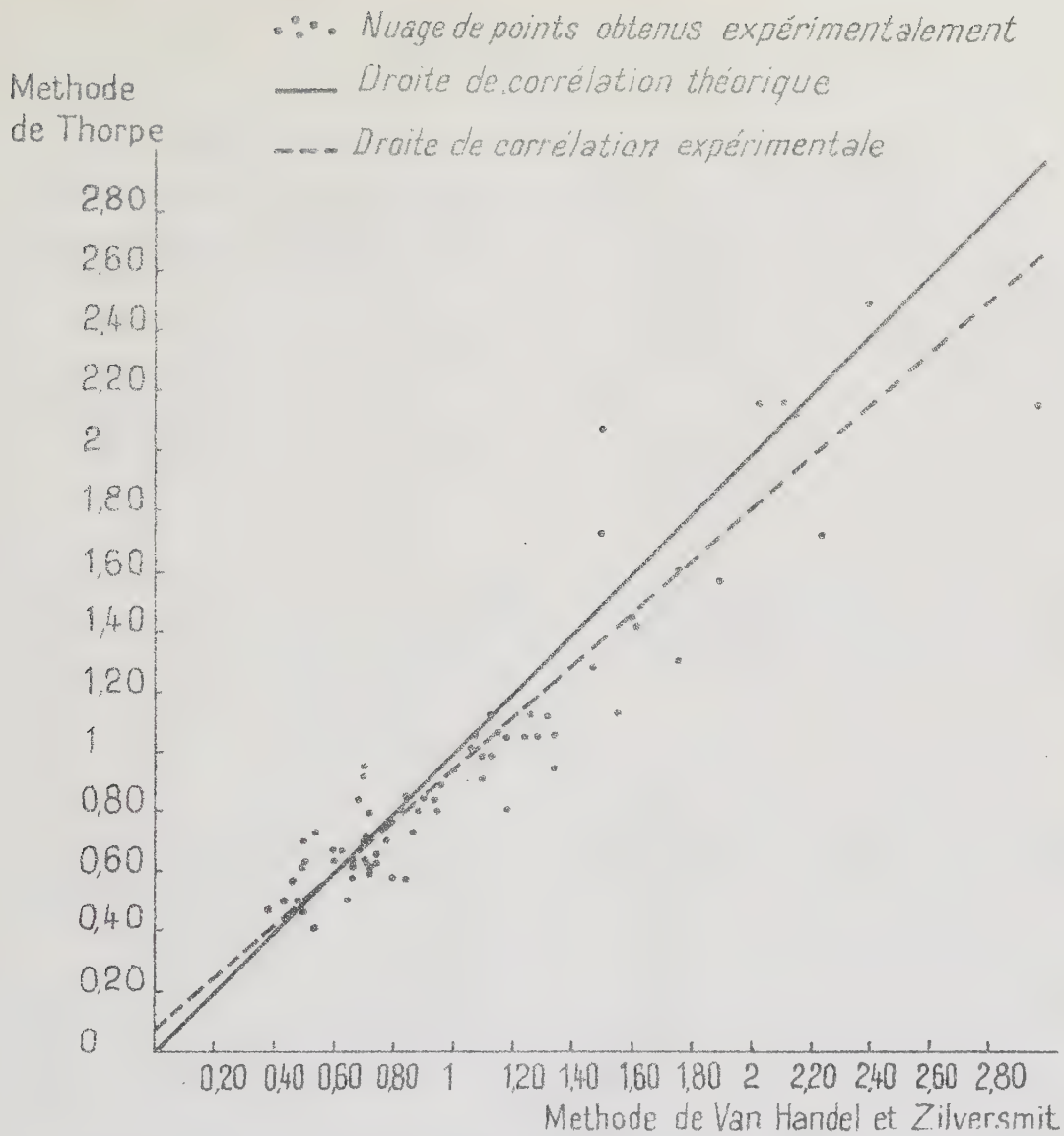
1 ? la technique de van HANDEL et ZILVERSMIT,

2. la technique de THORP sur le sérum dilué au 1/10 sans filtration

3. la technique de THORP sur le sérum dilué au 1/10 et filtré sur membrane Sartorius.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau page 48.


Seringue
Joint d'étancheité en plastique
Membrane filtrante
Grille support de la membrane



On remarque la similitude entre les taux des triglycérides donnés par la technique de van Handel et Zilversmit et leur estimation par la technique néphélométrique, lorsque celle-ci est pratiquée sur du sérum filtré. La filtration préalable du sérum est indispensable.

La concordance entre les deux méthodes est représentée graphiquement dans la figure ci-dessus. L'abscisse de chaque point représente le résultat de la méthode de van Handen et Zilversmit, et l'ordonnée l'estimation donnée par la méthode Thorp.

On note que la méthode chimique donne des taux légèrement plus élevés que ceux de la méthode néphélométrique. Cette différence est due aux triglycérides des chylomicrons dosés par la technique de van Handel et Zilversmit faite sur du sérum non filtré alors qu'ils sont éliminés par la filtration dans la méthode de Stone et Thorp.

L'étude de la corrélation entre les deux méthodes donne un coefficient r = 0, 93, ce qui confirme leur forte liaison avec un pourcentage d'erreur pratiquement nul.

Des auteurs anglais, JOYCE A., BUCKLY T. et collaborateurs ont tout récemment publié un travail qui utilise cette technique précédée d'une filtration différentielle sur des membranes de porosité décroissante. (27)

Alors que nous avons utilisé des membranes Sartorius MF 14, de porosité moyenne 0,1 μ , ils ont employé :

des membranes Sartorius MF 50 : pores de 0,45 μ
MF 14 : pores de 0,1 μ
MF 12 : pores de 0,05 μ

Ils obtiennent chez des sujets à jeun, après filtration sur ces trois sortes de membranes des corrélations entre lumière diffuse et le taux des triglycérides de 093 avec MF 50
091 avec MF 14
094 avec MF 12

Chez les sujets pris en phase digestive, la corrélation est bien moins bonne après passage sur membrane MF 50.

La corrélation est excellente entre la lumière diffusée par le sérum filtré sur MF 12 et les lipoprotéines porteuses de triglycérides neutres - Classe des lipoprotéines de Sf 20 à 400.

Ceci conduit à penser que la corrélation est non moins bonne avec les pré β lipoprotéines isolées sur l'électrophorèse selon NOBLE : celui-ci a montré, en effet, qu'il y avait une corrélation de 094 entre les pré β lipoprotéines isolées sur agarose et les lipoprotéines de Sf 20 à 400.

On peut donc dire que la simple mesure chez le sujet à jeun de la lumière diffusée par le sérum dans les conditions où l'indique THORP après filtration sur membrane Sartorius MF 12 donne des indications comparables à celles fournies par l'électrophorèse en agarose.

Selon JOYCE et BUCKLY, la différence entre la lumière diffusée après filtration sur MF 14 et MF 12 permettrait de mesurer chez des sujets à jeun

hyperlipémiques la présence des particules lipidiques endogènes que met en évidence la technique de séparation par gradient de densité de GORDIS.

Nous avons appliqué notre technique lors d'épreuves d'hyperglycémie sans constater de variations notables de la triglycéridémie, mais nous avons constaté l'apparition, un temps variable après l'absorption de 50g de glucose, soit 1/2 heure, soit 1 heure, soit 1 heure 1/2 et de façon inconstante, de chylomicrons dans le sérum de certains sujets.

C'est la différence de diffusion lumineuse entre le sérum filtré sur m membrane MF 14 et le sérum non filtré qui objective cela.

Voici quelques cas :

	Sujet 1		Sujet 2	
	Lumière diffusée sur sérum		Lumière diffusée sur sérum	
	non filtré	filtré	non filtré	filtré
Avant glucose	60	39	38	33
1/2 h. après	120	46	90	37
1 h "	52	41	56	36
1 h 30 "	42	36	47	34
2 h "	38	34	46	36
2 h 30 "	38	35	40	35
3 h 30 "	38	33	34	34

	Sujet n° 3		Sujet n° 4	
Sérum	Sérum		Sérum	
	non filtré	filtré	non filtré	filtré
	81	62	61	58
	71	53	95	56
	84	53	87	61
	98	53	77	61
	87	52	67	59
	67	52	80	58
	58	51	65	59

Il ne semble pas y avoir de corrélation directe avec les réponses d'hyperglycémies de type diabétique.

Nous pensons développer ce travail ultérieurement.

- FRACTIONNEMENT PHYSICOCHIMIQUE -

Nous passerons rapidement sur deux méthodes qui furent utiles mais qui sont, à présent, dépassées car elles ne donnent qu'une appréciation globale des β lipoprotéines lourdes et légères.

Réaction au phénol de KUNKEL -

Principe : On précipite par une solution phénolique de concentration saline déterminée, un complexe lipoprotéique dont l'importance est appréciée par néphélémétrie.

Réactif phénolique de Kunkel :

Phénol blanc pur R.P. crist.	1 g
Chlorure de sodium pur	12 g
Eau distillée q.s.p.	100 ml

Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière et ne pas avoir de coloration appréciable.

Technique : On opère sur le sérum obtenu après centrifugation soigneuse d'un sang veineux, prélevé chez un sujet à jeun depuis 12 heures.

Deux tubes sont préparés :

	Un tube réaction	Un tube témoin
Sérum	0,2 ml	
Réactif phénolique	3,6 ml	3,6 ml
Eau distillée		0,2 ml

On mélange immédiatement par retournement. On laisse 30 minutes à 20° C, en controlant la température.

On lit au photomètre en transmission à 650 mμ . Le 100 % de transmission est fait sur le tube témoin.

On exprime le résultat en degrés Vernes - 1 degré Vernes = 1/100 de de densité optique, soit 0,01 de densité optique. - Normale inférieure à 35° V.

Inconvénient : Ce test qui apprécie globalement les βlipoprotéines manque de spécificité car le fibrinogène et les dérivés de la fibrinolyse peuvent interférer.

Réaction de BURSTEIN et SAMAILLE -

Principe : On opère une précipitation sélective des lipoprotéines de faible densité (le groupe β), par l'héparine ou les héparinoïdes de synthèse, en présence de cation bivalent Calcium ou Magnésium.

Réactifs :

- Solution mère de Cl_2Ca 01 M

Chlorure de Calcium R. P. anhydre		11,1 g
Eau distillée	q. s. p.	1000 ml

- Solution fille de préparation extemporanée, par dilution au 1/4 de la solution-mère avec de l'eau distillée.

- Solution d'héparine à 1 % ou Solution de sulfate de Dextrane à 10 %.

Technique :

On opère sur le sérum obtenu de sujets bien à jeun.

Dans un tube à hémolyse, on mesure :

Chlorure de calcium	0,025 M	2 ml
Sérum		0,1 ml

On mélange et on lit la densité optique D_1 à 650 mμ .

On ajoute alors 40 microlitres d'héparine à 1 %.

On mélange par retournements 3 fois.

On attend exactement 4 mn, on mesure à nouveau la densité optique D à 650 mμ .

On calcule $D_2 - D_1$

Cette différence est proportionnelle au taux des βlipoprotéines.

Les normales sont comprises entre 20 et 45° Vernes.

Les chylomicrons, quand il y en a, floculent avec les βlipoprotéines.

Si ce test a perdu une grande part de son intérêt dans l'étude des hyperliprotéinémies, il a gardé son importance comme moyen analytique de fractionnement avant une analyse plus poussée.

- FRACTIONNEMENT IMMUNOLOGIQUE -

On peut amener la floculation des lipoprotéines du sérum à l'aide d'immunsérums anti βlipoprotéines.

L'appréciation se fait, après mélange du sérum et de l'antisérum dans un tube à microhématocrite, par mesure de la hauteur du précipité antigène anticorps après centrifugation.

- CHOIX DES TECHNIQUES D'ETUDE d'une HYPERLIPOPROTEINEMIE -

Avant toute chose, il conviebt de rappeler que toutes les déterminations devront être faites chez des sujets à jeun depuis 12 heures au moins, ce précédent repas ne devant pas comporter de lipides ou de glucides en quantité anormale.

Il est aussi très important de noter l'aspect du sérum, limpide, opalescent, ou lactescent, obtenu dans ces conditions de jeune.

L'utilisation simultanée de deux méthodes différentes dans leur principe, nous paraît indispensable à l'étude actuelle d'une hyperlipémie.

- En premier lieu : le dosage chimique des triglycérides neutres : pour ce faire, nous pensons que la méthode de van Handel et Zilversmit est excellente car en ne demandant que l'appareillage courant dans tout laboratoire, elle donne de bons résultats, reproductibles.

Le seul reproche à lui faire réside dans le temps qui est nécessaire pour la mener à bonne fin ; que ce soit pour un seul ou vingt dosages, elle demande près d'une demi-journée de travail.

Pour des bilans de groupe, il faudra passer à une méthode semi-automatique.

La méthode fluorométrique de KESSLER et LEDERER à l'autoanalyseur Technicon nous semble alors parfaitement convenir.

- En second lieu, il faut avoir une mesure qualitative et quantitative de la lipoprotéinémie. C'est la méthode d'électrophorèse sur agarose selon NOBLE que nous retiendrons.

Semblent ne plus avoir grand intérêt : les réactions de floculation des β lipoprotéines et le dosage des lipides totaux que l'on traîne comme une vieille habitude.

Aux deux méthodes précédemment choisies, nous adjoindrons volontiers comme méthode de contrôle, celle de néphélémétrie de diffusion selon STONE et THORP. Elle nous paraît excellente pour plusieurs raisons :

-Elle aborde la détermination des lipoprotéines porteuses de triglycérides par une voie toute différente des autres et la concordance de ses résultats avec ceux des deux autres méthodes est, dans les cas douteux, réconfortante pour l'analyste.

- Elle ne modifie pas comme peut le faire dans une certaine mesure l'électrophorèse, le phénomène étudié.

- En la complétant avec des filtrations sélectives, on peut avoir une idée de la taille des lipoprotéines en cause, et c'est là une donnée fort intéressante.

- Enfin, elle est simple et rapide à effectuer.

Pour conclure, dosage des triglycérides neutres et électrophorèse sur agarose selon NOBLE, permettent en y adjoignant le dosage du cholestérol, de débrouiller l'étiologie des hyperlipopr otéinémies à la lueur de la classification de FREDRICKSON.

- CLASSIFICATION de FREDRICKSON - (19,20)

Quelque peu attaquée aujourd'hui, et même si, trop schématique, elle ne rend pas compte de tous les faits, il faut reconnaître qu'elle a été et est encore très précieuse pour la compréhensione des hyperlipémies.

FREDRICKSON a rangé les hyperlipémies en cinq classes.

Cette classification est basée sur les fractionnements de l'électrophorèse selon LEES et HATCH et sur agarose. Cinq types sont décrits.

Type I : Présence de chylomicrons.

Type II : Augmentation des βlipoprotéines normales - se rangent dans ce cadre les hypercholestérolémies.

Type III: Présence d'une large bande de lipoprotéines en position β préβ . Il s'agit de lipoprotéines anormales riches en triglycérides et de faible densité.

Type IV : Augmentation des pré βlipoprotéines toujours présentes normalement dans la méthode de NOBLE et proteuses de triglycérides.

Type V : Augmentation simultanée des chylomicrons et des pré βlipoprotéines.

CLOAREC (14) a repris cette classification en la confrontant aux autres données fournies par l'étude des hyperlipémies.

Nous donnerons, pour finir,cette étude qui nous paraît bien résumer les faits.

TYPE I - Induit par les graisses

Aspect du sérum	lactescent
Cholestérol total	légèrement élevé
Triglycérides	très élevés
Chylomicrons	très augmentés
Béta-lipoprotéines	normales
Pré-béta-lipoprotéines	normales
Activité de la lipoprotéine-lipase après héparine	diminuée
Hyperglycémie provoquée	normale
Gradient de sédimentation dans la polyvinylpyrrolidone	flottation en surface (correspond aux chylomicrons)
Composition en acide gras de l'extrait lipidique	semblable à celle des graisses alimentaires

TYPE II - Hyper-béta-lipoprotéinémie - Hypercholestérolémie, sans hypertriglycéridémie associée.

Aspect du sérum	clair
Cholestérol total	augmenté
Triglycérides	normaux
Chylomicrons	normaux
Béta-lipoprotéines	normales
Activité de la lipoprotéinelipase après héparine	normale
Hyperglycémie provoquée	normale

TYPE III - Avec hypertriglycéridémie associée.

Aspect du sérum	clair ou trouble
Cholestérol total	augmenté
Triglycérides	élevés
Chylomicrons	normaux
Béta-lipoprotéines	élevées
Pré-béta-lipoprotéines	augmentées
Activité de la lipoprotéine-lipase après héparine	normale
Hyperglycémie provoquée	type pré-diabétique
Gradient de sédimentation dans la P. V. P.	flottation au fond
Composition en acide gras de l'extrait lipidique	en régime riche en hydrate de carbone, semblable à celle observée dans le type IV.

TYPE IV - Induit par les hydrates de carbone.

Aspect du sérum	clair ou trouble
Cholestérol total	normal ou légèrement augmenté
Triglycérides	élevés
Chylomicrons	normaux
Béta-lipoprotéines	normales
Pré-béta-lipoprotéines	augmentées
Activité de la lipoprotéine-lipase après héparine	normale
Hyperglycémie provoquée	type pré-diabétique
Gradient de sédimentation dans la P. V. P.	flottation au fond du tube (correspondant aux pré-béta-lipoprotéines ou lipomicrons)
Composition en acide gras de l'extrait lipidique	comportant une prédominance d'acides gras, provenant de la lipogénèse endogène (beaucoup d'acide palmitique ou d'acide linoléique).

TYPE V - Induit par un régime hypercalorique.

Aspect du sérum	lactescent
Cholestérol total	légèrement augmenté
Triglycérides	élevés
Chylomicrons	très augmentés
Béta-lipoprotéines	normales
Pré-béta-lipoprotéines	augmentées
Activité de la lipoprotéine-lipase après héparine	normale ou diminuée
Hyperglycémie provoquée	type pré-diabétique
Gradient de sédimentation dans la P. V. P.	flottation en surface et fond
Composition en acide gras de l'extrait lipidique	non caractéristique.

Le grand intérêt de l'étude ainsi menée réside dans les conséquences thérapeutiques que l'on en tire.

On se trouve en présence d'une hyperglycéridémie exogène : type I de Fredrickson qui régressera en supprimant l'apport alimentaire en graisses ou dans le diabète insulin oprive en apportant l'insuline.

On se trouve en présence d'une hypertriglycéridémie endogène type III et type IV de Fredrickson, fréquemment associée à des troubles de la glycorégulation. En ce cas, il s'agit à l'origine d'un déséquilibre nutritionnel de suralimentation : c'est la diminution de la ration glucidique de l'alimentation qui apportera l'amélioration du bilan lipidique et de façon spectaculaire.

Ceci nous paraît un bel exemple des possibilités d'une thérapeutique guidée par une bonne compréhension de la physiopathologie et montre tout le bénéfice que la biologie et la clinique peuvent tirer d'un travail en équipe.

- - -

CONCLUSIONS

Nous avons voulu rechercher les meilleures méthodes d'étude de la triglycéridémie : cet examen s'est, en effet, avéré primordial pour l'établissement du bilan lipidique d'un malade.

Nous avons tout d'abord rappelé la structure chimique des triglycérides, triesters résultant de l'estérification des trois fonctions alcool du glycérol par trois acides gras, identiques ou différents, saturés ou insaturés.

Mais nous avons dû constater que dans l'organisme, la solubilisation et le transport des triglycérides, substances très hydrophobes, exigeaient la présence de protéines spéciales qui forment avec eux des "cénapses lipoprotéiques", décrites dès 1929 par MACHEBOEUF.

Nous avons ensuite examiné succinctement le métabolisme de ces graisses neutres dans l'organisme : dans le sang circulant, leur taux est, en effet, le résultat de l'équilibre :

- de l'anabolisme des tissus hépatiques et adipeux et du catabolisme cellulaire pour la fraction des triglycérides endogènes ;
- de l'apport digestif dont nous avons vu le cheminement complexe pour ce qui est des triglycérides exogènes.

Nous avons alors fait l'inventaire des méthodes directes et indirectes d'étude de leur taux sanguin.

Deux voies d'examen ont été retenues :

1°- Pour l'appréciation quantitative de la triglycéridémie, les méthodes chimiques proposent deux solutions selon les séries d'examen à effectuer :

A - S'il s'agit de séries de dix à vingt dosages, la méthode de van Handel et Zilversmit semble la meilleure : après extraction différentielle des triglycérides neutres, leur saponification libère le glycérol : celui-ci est oxydé, quantitativement, par le périodate, le formol dosé par photométrie de la réaction colorée qu'il donne avec l'acide chromotropique en milieu sulfurique à 100°.

Cette méthode est assez longue mais sûre. Elle donne des chiffres normaux allant de 0,50 g par litre à 1,40 g par litre, chiffres exprimés en tripalmitine.

B - S'il s'agit de séries plus importantes, la méthode de Kessler et Lederer s'impose : l'extraction est manuelle, le dosage s'effectue automatiquement à l'autoanalyseur Technicon par fluorométrie : l'aldéhyde formique obtenu, comme dans la technique précédente, donne par condensation, en milieu milieu ammoniacal avec la di hydroxyacétone, un composé fluorescent.

Les résultats obtenus sont comparables à ceux donnés par van Handel et Zilversmit.

2° - Pour apprécier la qualité de la triglycéridémie, nous avons retenu une méthode physique, le fractionnement électrophorétique des lipoprotéines.

C'est la méthode de Noble qui a nos préférences car elle donne une différenciation fine et reproductible.

On opère par électrophorèse en milieu albumineux dans un gel d'agarose porté par une plaque de verre.

La coloration est faite au Noir soudan, un photomètre intégrateur permet de déterminer le pourcentage des diverses fractions.

Nous avons retenu comme normales :

α lipoprotéines	10 à 30 %
pré β lipoprotéines	5 à 25 %
β lipoprotéines	50 à 75 %

Nous avons examiné une méthode indirecte rproposée par Stone et Thorp : elle permet la mesure de la triglycéridémie par l'étude de la lumière diffusée par les lipoprotéines du sérum. Une abaque a été établie par les auteurs : nous avons pu vérifier son bien-fondé en comparant sur plusieurs centaines de cas ses résultats à ceux fournis par la méthode de Handel et Zilversmit.

La corrélation s'est avérée excellente.

Il est ainsi possible d'exécuter en quelques minutes un dosage des triglycérides et de contrôler en abordant le problème par des voies toutes différentes, les résultats des méthodes chimiques. Il est également possible, en opérant après filtration du sérum sur des membranes de porosité variable, d'étudier la chylomicronémie.

Détermination des lipoprotéines par électrophorèse sur agarose et mesure de la triglycéridémie permettent, couplées avec celles du cholestérol, d'éclairer la nature d'une hyperlipémie en se référant à la classification donnée par Fredrickson.

Celle-ci, peut-être quelque peu contestable, est néanmoins pratique.

Fredrickson a défini cinq types d'hyperlipémie :

- Le type I : présence de chylomicrons
  c'est une hypertriglycéridémie exogène.
- Le type II : augmentation des βlipoprotéines normales
  c'est l'hypercholestérolémie.
- Le type III : augmentation des β et des pré βlipoprotéines
  c'est l'hypertriglycéridémie endogène accompagnée souvent d'hypercholestérolémie.
- Le type IV : augmentation isolée des pré βlipoprotéines
  c'est une hypertriglycéridémie endogène.

- Le type V : augmentation des pré βlipoprotéines couplées à la présence de chylomicrons.

En conclusion, le dosage chimique des triglycérides accompagné d'une électrophorèse des lipoprotéines sur agarose éclairant l'étiologie d'une hyperlipémie, permettra d'orienter le traitement diététique :

- soit, vers un régime hypocalorique pauvre en hydrates de carbone ;
- soit, vers un régime restrictif en graisses, moyen très efficace d'améliorer cette catégorie de malades, ce qui suffit à justifier ces moyens d'étude.

-=-

Vu, le Président de Thèse :

C. DEBRAY.

Vu, le Doyen de la Faculté :

J. BAUMANN.

Vu et Permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris,

M. MALLET.

BIBLIOGRAPHIE

Nous avons utilisé un certain nombre de mises au point récentes, et d'autres un peu moins récentes, sur le sujet des triglycérides : nous les citons au préalable :

- - - -

- Biochimie médicale : enzymes et métabolisme,
Michel POLONOWSKI - 1969, Masson éditeur.

- Biochimie des lipides - Métabolisme - Techniques d'exploration. Conférences prononcées et techniques présentées lors des Journées nationales de Biologie organisées par l'Association des Internes et anciens internes en pharmacie des Hôpitaux de Lyon, 22 et 23 oct. 1966 - Simep éd. Lyon.

- BOUCHON J. P. : Thèse doctorat d'Etat Médecine - Paris - 1964.

- Métabolisme et techniques d'exploration des triglycérides circulants. Pathologie et Biologie, Swynghedauw - janvier 1965.

- Problèmes actuels de biochimie appliquée, publiés sous la direction de Maurice Louis GIRARD. - 3è série 1970.
Les hyperlipoprotéinémies, conceptions modernes et méthodes d'exploration - Jacques CANAL et Jacques ROUFFY - Masson éd.

---

1. ALTMANN A., BACH A., et METAIS P.
Annales de Biologie clinique, 1964.

2. ARVY L.,
Techniques actuelles d'histoenzymologie, les estérases carboxyliques.
Biol. Med. Paris, 1958, 47, 12.

3. ASHWORTH C. T., STEMBRIDGE V.A., SANDERS E.
Lipid absorption, transport and hepatic assimilation studies with electron microscopy.
Am. J. Physiol., 1960, 198, 1326.

4. BIERMAN E. L. et coll.
Characterization of fat particles in plasma of hyperlipemics subjects maintained on fat free high carbohydrate diets.
J. Clin. Invest., 1965, 44, 2, 261 à 270.

5. Biochimie des lipides
Monographie des Hôpitaux de Lyon.
Identification et dosage par chromatographie gazeuse des acides gras des lipides sériques.

6. BISERTE, SEZILLE G., BERTRAND M., et JAILLARD J.
Explorations lipidiques au cours du diabète.
Ann. Biol. Clin., 1964, 22, n° 7 - 9, pp. 873 à 897.

7. BLOMSTRAND R., BORGSTROM B., DAHLBACK O.
Extent of total hydrolysis of dietary glycerides during digestion and absorption in the human.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) - 1959, 102, 204.

8. BORGSTROM B.
Studies on pancreatic lipase. Biochemical problems of lipids.
1955, Proceed. 2nd Int. Conf. at Ghent, 179.

9. BORGSTROM B.
Digestion and absorption of fat. In "Chemistry of lipids as related to atherosclerosis", 1958, Thomas ed., page I H. Publ. Springfield, 137.

10. BORGSTROM B.
Metabolism of glycerides. In " Lipid metabolism", 1960, Bloch K. ed., Wiley, N. Y., 128.

11. CANAL J., ROUFFY J.
Les hyperlipoprotéinémies.
Problèmes actuels de biochimie appliquée - 3è série 1970 - Masson éd.

12. CARON M., BARBIER J. L. et GUIGNIER F.
Microélectrophorèse des lipoprotéines sériques sur acétate de cellulose.
Feuillets de biologie, n° 56, Sept. 1970.

13. CARLSON L.A., WADSTROM L.B.
Détermination of glycerides in blood serum.
Clin. Chim. Acta, 1959, 4, 197.

14. CLOAREC M. et Coll.
Le dépistage de la maladie coronarienne.
La Vie Médicale, sept. 1967, pp. 1011 à 1027.

15. COLAS BELCOUR et Coll.
Etude électrophorétique des lipoprotéines du sérum sur gel d'agarose.
sous presse.

16. de GENNES J. L., POLONOVSKI J.
Les lipoprotéines sériques. I. Techniques de fractionnement.
Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 1960, III, 275.

17. DESNUELLE P., SAVARY P.
Specificities of lipases
(Review).
J. Lip. Res., 1963, 4, 369.

18. DEUSI H. J. Jr
The lipids. Their chemistry and biochemistry, 1955
Interscience ed., N. Y.

19. FREDRICKSON D. S. et LEES R. S. -
Circulation, 1964, 30 (suppl. 3), 20.

20. FREDRICKSON D. S. et LEES R. S.
Circulation, 1965, 31, 321.

21. GALETTI F.
A simplified procedure for the calorimetric determination of serum esterified fatty acids.
Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 749.

22. GIBSON D. M.
Fatty acid biosynthesis. In "Progress in chemistry of fats and other lipids".
Vol. VI, 1963, Holman R. T., Lundberg W. O. et Malkin ed., Pergamon Press, Oxford.

23. GLOSTER J. et FLETCHER R. F.
Clin. Chim. Acta, 1966, 13, p. 235 à 240.

24. GORDIS E.
Demonstration of two kinds of fat particles in alimentary lipemia with polyvinylpyrrolidone gradient columns.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1962, 110, 3, 657 à 661.

25. Guy GRAND
Les cahiers de diabétographie.
Colloque d'enseignement post universitaire.
Lyon, 6 mars 1970.

26. HANDEL E. (van), ZILVERSMIT D. B.
J. Lab. Clin. Med., 1957, 50, 1, pp. 152 à 157.

27. JOYCE A., BUCKLY T. et Coll.
The application of nephelometry in the estimation of serum and plasma glycerid levels.
Cl. Ch. Acta, 1970, 28, p. 133 à 140.

28. KATES M.
Lipolytic enzymes in "Lipide metabolism ".
1960, Bloch K. ed., Wiley, N. Y., 165.

29. KESSLER G. et LEDERER H.
Automation in analystival chemistry
ed. L. T. Skeggs, N. Y., 1965, p. 341 à 344.

30. LEES R. S. et HATCH F. T.
Electrophorèse des lipoprotéines sériques en milieu albumineux.
J. Lab. Clin. Med., 1963, 61, 518.

31. MATTSON F. H., VOLPENHEIM R. A.
Synthesis and properties of glycerides.
J. Lipid Res., 1962, 3, 281.

32. METAIS P., BACH A., ULRICH J. M.
Ann. Biol. Clin., 1964, 22, 783 à 796.

33 - NOBLE R. P.
Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel.
J. of Lipid Research, Vol. 9, 1968.

34. NOBLE R. P., HATCH F. T., MAZRIMAS J. A. et Coll.
Comparison of lipoproteins analysis by agarose gel and paper electrophoresis with analytical ultracentrifugation.
Lipids (Chicago), 1969, tome 4, pp. 55 à 59.

35. PALAY S. L., KARLIN L. J.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1959, 5, 373-384.

36. ROUILLAC R.
La Vie Médicale, Sept. 1967.

37. STONE M. C., THORP J. M.
Cl. Ch. Acta, 1966, 14, 812 à 830.

38. TURNER D. A.
Lipids of bile and intestinal synthesis of triglycerides.
Fed. Proc., 1962, 21, 25.

39. WAGLE S. R.
Effects of biotin deficiency on carbohydrate metabolism.
Arch. Biochem. Biophys., 1963, 103, 267.

40. WAKIL S. J.
Mechanism of fatty acid synthesis.
J. Lipid Res., 1961, 2, 1

- - - - -

TABLE des MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
LES LIPIDES	2
STRUCTURE	2
PROPRIETES	4
LES TRIGLYCERIDES	4
METABOLISME	5
Triglycérides endogènes	5
Triglycérides exogènes	6
METHODES D'ETUDE	8
METHODES CHIMIQUES	8
= Détermination des acides gras estérifiés selon Galetti	8
= Dosage du glycérol libéré par les triglycérides .	9
- Par voie enzymatique	9
Méthode de ALTMANN, BACH et METAIS	9
- Par voie chimique	14
Méthode de CARLSON et WADSTROM	14
Méthode de van HANDEL et ZILVERSMIT	15
Méthode semi-automatique de KESSLER & LEDERER	21
= Détermination chimique après fractionnement	24
- par chromatographie gazeuse	24
- par chromatographie en couche mince	24
METHODES PHYSIQUES D'ETUDE DES LIPOPROTEINES	27
= Ultracentrifugation	27
- Méthode de fractionnement	28
- Etude des fractions isolées	31
= Electrophorèse	33
- sur papier	34
Méthode de GRASSMANN et HANING	34
Méthode de LEES et HATCH, en tampon albumineux	35
- sur acétate de cellulose	37
Technique de CARON, BARBIER et GUIGNIER	
- sur agarose	38
Méthode de NOBLE modifiée	38
Technique.....	40
Résultats	41